Zum Vorkommen von chemoresistenten Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae in Futtermitteln

Nikolaus Kowollik

Diss München
1984

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenmedizin
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. DDr. h. c. A. Mayr

Arbeit angefertigt unter Leitung von Frau Prof. Dr. B. Gedek

ZUM VORKOMMEN VON CHEMORESISTENTEN ENTEROBACTERIACEAE UND PSEUDOMONADACEAE IN FUTTERMITTELN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Nikolaus Kowollik
aus
Karlsruhe
München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. B. Gedek

Korreferent: Prof. Dr. H. Zucker

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

Meinen Eltern und meiner Schwester

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 1

2. SCHRIFTTUM 1

2.1. Vorkommen und systematische Stellung der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae ... 1

2.2. Bekämpfung von Nutzpflanzenkrankheiten mit Pflanzenbehandlungsmitteln 6

2.2.1. Einsatz von Antibiotika 6

2.2.1.1. Vorteile und Nachteile 6

2.2.1.2. Antibiotika gegen Krankheiten durch Bakterien und Pilze 9

2.2.1.3. Antibiotika gegen Krankheiten durch Viren . 13

2.2.1.4. Art und Umfang der Anwendung 15

2.2.2. Verwendung von Verbindungen mit Schwermetallen und Metalloiden wie Arsen 16

2.2.3. Rechtliche Situation in der Bundesrepublik Deutschland 21

2.3. Auftreten von Resistenz gegenüber Pflanzenbehandlungsmitteln auf Pflanzen vorkommender Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae 25

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Methoden 31

3.1.1. Anzahl der Proben und Art der untersuchten Futtermittel 31

3.1.2. Selektive Anzucht der in Futtermitteln vorkommenden Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae 32

3.1.2.1. Verfahren mit quantitativer Erfassung des jeweiligen Keimgehaltes 32

3.1.2.2. Verfahren zur qualtitativen Erfassung, vornehmlich von Keimen mit Resistenz gegenüber Metallionen 33

3.1.3. Isolierung von Enterobacteriaceae, insbesondere der KES-Gruppe, sowie von Pseudomonadaceae 34

3.1.4 Identifizierung der isolierten gramnegativen Stäbchenbakterien 35

3.1.5. Empfindlichkeitsprüfung der Isolate gegenüber Antibiotika und synthetischen Chemotherapeutika 37

3.1.5.1. Durchführung des Plattendiffusionsverfahrens 37

3.1.5.2. Interpretation der Antibiogramme 38

3.2. ERGEBNISSE UND DEREN BESPRECHUNG

3.2.1. Ergebnisse des Verfahrens mit quantitativer Erfassung der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae 39

3.2.1.1. Keimgehalt der Futtermittel ohne Zusatz eines auf Chemoresistenz selektierenden Agens 39

3.2.1.2. Keimgehalt der Futtermittel bei Zusatz von Streptomycin oder Chloramphenicol als Selektor 39

3.2.1.3. Keimgehalt der Futtermittel nach Zusatz von As^{3+}-, Cu^{2+}- und Zn^{2+}-Ionen als Selektor 41

3.2.2. Ergebnisse der qualitativen Erfassung von Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae .. 47

3.2.2.1. Resultat der Keimdifferenzierung 47

3.2.2.2. Metallionen als Selektor von Pseudomonadaceae und verschiedenen Arten und Gattungen der Enterobacteriaceae 50

3.2.2.3. Ansprechbarkeit der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae gegenüber Antibiotika und synthetischen Chemotherapeutika. 53

3.2.2.4. Gegenüberstellung von Anzuchtverfahren und Häufigkeit des Nachweises von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei den Isolaten 61

3.2.2.5. Häufigkeit von Einfach- und Mehrfachresistenz bzw. Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika und sich daraus ergebende Resistenzmuster unter Berücksichtigung der verwendeten Metallionen als Selektor 68

4. DISKUSSION 76

5. ZUSAMMENFASSUNG 79

SUMMARY 81

6. LITERATURVERZEICHNIS 83

LEBENSLAUF

1. EINLEITUNG

Während der letzten 25 Jahre verursachten immer häufiger ubiquitär verbreitete, gramnegative Stäbchenbakterien der Familien Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae nosokomiale Infektionen des Menschen (WHO, 1978). Die Keime sprechen größtenteils auf eine Chemotherapie nicht an, da sie sich gegenüber Antibiotika als multiresistent erweisen. Sie sind im Laufe der Jahre infolge ihrer begrenzten Ansprechbarkeit auf Antibiotika auch beim Nutztier als Problemkeime stärker in den Vordergrund getreten und zeigten dann nicht nur Resistenz gegenüber Antibiotika, sondern sie erwiesen sich vielfach zugleich auch als unempfindlich gegenüber einer Reihe von synthetischen Chemotherapeutika sowie Desinfektionsmitteln und Umweltchemikalien, vor allem, wenn diese Verbindungen Schwermetalle oder Metalloide enthalten (JACOBY und SWARTZ, 1980).

Da sich die dafür verantwortlichen Resistenzdeterminanten bei diesen Bakterien in der Regel auf Plasmiden befinden und diese genetische Information jederzeit weitergegeben werden kann, wenn paarungsbereite Zellen aufeinandertreffen, und die Milieuverhältnisse es zulassen, verdient Beachtung, in welchem Umfang heute Vertreter dieser Keimarten in Futtermitteln anzutreffen sind. Mit der Nahrung aufgenommen können diese Keime nämlich, unter der Voraussetzung, daß sie bei der Magen-Darm-Passage zur Vermehrung gelangen, entweder ihre Resistenzeigenschaften auf die dort ansässigen Repräsentanten der Darmflora, worunter sich fakultativ pathogene Arten befinden, übertragen. Oder sie können gegebenenfalls sogar selbst eine Krank-

heit hervorrufen, die mit den derzeit zur Verfügung stehenden Chemotherapeutika nicht zu behandeln ist (ROLLE und MAYR, 1978).
Es wurde mir deshalb die Aufgabe gestellt, eine repräsentative Zahl von Futtermitteln auf das Vorkommen derjenigen Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae zu untersuchen, die als Epiphyten sowohl in der Flora des Menschen und des Tieres als auch bei Pflanzen anzutreffen sind und die sich in besonderem Umfang als chemoresistent erweisen sollen.
Dabei wurde Wert darauf gelegt, die Keime nicht nur qualitativ zu erfassen, sondern zugleich auch deren resistente Anteile gegenüber ausgewählten Antibiotika und Metallionen festzustellen.
Bei der Prüfung der Keime auf Chemoresistenz sollte dem Einsatz von Antibiotika und chemischen Verbindungen mit antibakterieller Wirkung als Pflanzenbehandlungsmittel Rechnung getragen werden, insofern sich daraus Konsequenzen für die Therapie bakterieller Infektionen durch diese Keime bei Mensch und Tier ergeben können.

2.0. SCHRIFTTUM

2.1. Vorkommen und systematische Stellung der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae

Den lebenden Keimbesatz von Futtermitteln repräsentieren in erster Linie Bakterien, seltener Pilze oder Viren (GEDEK, 1974). Bei den Bakterien wiederum handelt es sich vornehmlich um grampositive und gramnegative Stäbchenbakterien (JANSEN, 1974). Die gramnegativen Stäbchenbakterien gehören, von wenigen Ausnahmen abgesehen, zwei Familien an, die sich durch eine hohe Anpassungsfähigkeit auszeichnen und zugleich sehr anspruchslos sind. Infolgedessen sind sie an verschiedenen Standorten anzutreffen, und zwar in der freien Natur (z.B. im Wasser oder Boden) ebenso, wie innerhalb des Organismus (z.B. Darm) höher entwickelter Lebewesen (ROLLE und MAYR, 1978). Je nach ihrer Artzugehörigkeit treten sie bei Mensch, Tier und Pflanze als Krankheitserreger und/oder Saprophyt bzw. Epiphyt auf.
Die Vertreter der beiden Familien unterscheiden sich weniger morphologisch, als vielmehr stoffwechselphysiologisch.
Die größere Formenvielfalt weist die Familie Enterobacteriaceae mit 11 verschiedenen Gattungen auf (BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology, 1974). Die mittelgroßen, ziemlich plumpen Stäbchen mit abgerundeten Enden, die unbeweglich oder durch peritriche Geißeln beweglich sind, verhalten sich morphologisch weitgehend einheitlich. Unterschiede bestehen vor allem im Zellwandaufbau, wodurch sie sich

größtenteils serologisch differenzieren lassen und hinsichtlich einzelner Stoffwechselleistungen. Alle Enterobacteriaceae vergären Glucose, verhalten sich Cytochromoxidase-negativ, aber Katalase-positiv und reduzieren in der Regel Nitrat zu Nitrit. Obligat menschen- und/oder tierpathogene Arten gehören den Gattungen Shigella, Salmonella und Yersinia an, die Gattung Erwinia umfaßt die pflanzenpathogenen Arten. Die Arten der anderen Gattungen, insofern sie als Krankheitserreger auftreten, gelten nur als fakultativ pathogen. Von diesen rufen die Vertreter der Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Gruppe, obwohl sie gelegentlich wie E. coli im Darm von Mensch und Tier anzutreffen sind, nicht enteritische Krankheiten hervor. E. coli und alle anderen Arten der Gattungen Proteus, Citrobacter und Edwardsiella entfalten eine pathogene Wirkung in erster Linie im Darm von Mensch und Tier.

Im Gegensatz zu den Enterobacteriaceae, die zur aeroben und anaeroben Lebensweise befähigt sind, benötigen die Pseudomonadaceae stets Luftsauerstoff. Der Stoffwechsel dieser geraden oder gekrümmten, durch polare Geißeln beweglichen Stäbchenbakterien ist stets oxidativ. Zur Abtrennung von den Enterobacteriaceae, mit denen sie am gleichen Standort vorkommen können, ist die Bildung von Cytochromoxidase von entscheidender Bedeutung (ROLLE und MAYR, 1978).

Darüber hinaus unterscheiden sich die Arten der zwei zu dieser Familie gehörenden Gattungen Pseudomonas und Xanthomonas durch die Fähigkeit, verschiedene C- und N-Quellen zu verwerten. Während es sich bei der Gattung Xanthomonas um Keime handelt, die derart an den pflanzlichen Organismus angepasst sind,daß ihnen nur als Krankheitserreger bei den Pflanzen Bedeutung zukommt,

rufen die Arten der Gattung Pseudomonas mit unterschiedlicher Wirtsspezifität Krankheiten bei Mensch, Tier und Pflanze hervor.
Ins Futtermittel gelangen die Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae durch ihr Vorkommen im Boden, im Wasser, auf der Pflanze und in den Futtermittel verarbeitenden Betrieben, die durch die Verarbeitung tierischer Abfälle auch mit denjenigen Enterobacteriaceae kontaminiert sein können, die primär ihren Standort im Darm von Mensch und Tier haben. Demzufolge ist mit dem Vorkommen fast jeder Art dieser zwei Familien gramnegativer Stäbchenbakterien zu rechnen, wenn auch mit unterschiedlicher Häufigkeit und mit Differenzen in den jeweiligen Keimzahlen, denn für manche Vertreter ist das Futtermittel lediglich ein Vektor, während es für andere zugleich ein Substrat für die Vermehrung ist (GEDEK, 1974).
Beide Familien werden nach BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology (1974) den chemoorganotrophen Bakterien zugeordnet und sind dort in Teil 7 und 8 aufgeführt.

2.2. Bekämpfung von Nutzpflanzenkrankheiten mit Pflanzenbehandlungsmitteln

Als eines der größten Probleme der kommenden Jahrzehnte ist die Ernährung von Milliarden von Menschen anzusehen. Der Einsatz chemischer Mittel zur Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten ist demzufolge nach wie vor unerläßlich. Die Nachteile, die sich aus der nicht auszuschließenden Umweltverschmutzung ergeben können, sind sicher geringer und leichter zu bewältigen, als ein Verzicht auf Pflanzenbehandlungsmittel. Es ist eine Tatsache, daß ein Wachstum bei der Hälfte aller Feldfrüchte der Welt ohne Fungizide nicht zu verzeichnen gewesen wäre.
Der entstehende Nahrungsmangel bei Verbot der Anwendung chemischer Mittel zur Erhaltung und Steigerung des Ertrages bei Feldfrüchten würde am härtesten die Länder treffen, die am stärksten vom Nahrungsmittelexport und -import abhängig sind, die Entwicklungsländer (OGAWA et al., 1977).

2.2.1. Einsatz von Antibiotika

2.2.1.1. Vorteile und Nachteile

Bakterielle Erkrankungen haben erst seit dem Einsatz von Antibiotika erfolgreich bekämpft werden können.
Die Preise der organischen Quecksilber- und Kupferverbindungen als auch heute noch hauptsächliche Bestandteile

der Fungizide steigen ständig auf dem Weltmarkt und sind im Begriff, für Entwicklungsländer und andere Länder, die sie importieren müssen, unbezahlbar zu werden. In diesen Gebieten ist bald mit einem steigenden Verbrauch an Antibiotika zu rechnen. Wäre die Technologie zur Herstellung von Antibiotika genügend ausgereift, könnten Produktionseinheiten in den Ländern geschaffen werden, in denen sie zum Einsatz kommen sollen. Der Aufwand an Geräten ist relativ gering und ihr Transport bringt wenige Probleme mit sich.

Für Bekämpfungsprogramme von Pflanzenkrankheiten sind anstelle von Tonnen von chemischen Fungiziden und Bakteriziden nur einige Kilogramm Antibiotika notwendig (THIRUMALACHAR, 1968).

Die beim Gebrauch von Antibiotika nicht gänzlich zu vermeidenden phytotoxischen Symptome wie z.B. dürftige Keimung der Samen oder entblätterte Pflanzen, werden allerdings nur durch Zusätze anderer Stoffe reduziert, und zwar durch Chlorophylline im Fall von Cycloheximid oder durch Beigabe von Ca-, Mg- oder Mn-Ionen bei der Anwendung von Streptomycin (THIRUMALACHAR, 1968).

Hinsichtlich der Verwendung von Pflanzenteilen, die als Nahrungsmittel für den Menschen oder als Futter für Tiere dienen, sind Antibiotika, die Bildung von Rückständen betreffend, mit geringeren Risiken einsatzfähig als Chemikalien, denn sie werden in der Regel schnell abgebaut (THIRUMALACHAR, 1968).

MISATO et al. (1976) nehmen auch einen schnellen Abbau durch Bodenorganismen an und stellen den Vorteil der ungleich geringeren Menge an eingesetzten Antibiotika gegenüber Pestiziden dank der sehr geringen Konzentrationen heraus, in denen die ersteren heute eingesetzt werden.

Bei der Produktion von Antibiotika können landwirtschaft-

liche Produkte genutzt werden, die mit Sonnenenergie erzeugt werden. Als weiterer Vorteil wird bei Antibiotika angesehen, daß die Initialkosten relativ gering sind, denn in einer Produktionseinheit kann die Grundausstattung für die Produktion verschiedener Antibiotika genutzt werden, ganz im Gegensatz zur Produktion chemischer Verbindungen. GOODMAN (1980) ist dagegen der Auffassung, daß zwar bekannt sei, daß Antibiotika im Boden abgebaut werden, jedoch sei weitgehend unbekannt, wie schnell das vor sich geht. Außerdem seien die Auswirkungen der Bakterienflora auf dem Boden noch wenig erforscht.
Zukunft wird dem Einsatz von Antibiotika bei der Lagerung von Nahrungsmitteln bzw. der Verhinderung der Fäulnis von Feldfrüchten nach der Ernte vorausgesagt (THIRUMALACHAR, 1968).
Ein Einsatz sei besonders für tropische Länder anzustreben, wo das meiste Obst und Gemüse frisch genossen wird und Kühleinrichtungen den Wohlhabenden vorbehalten sind.
Antibiotika haben große Bedeutung in der Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten besonders dort erlangt, wo chemische Bekämpfungsmittel mit Metallen auf Grund ihrer hohen Phytotoxizität versagen. Die Tatsache jedoch, daß Resistenz an bestimmten Orten nicht auftritt, ermutigt dazu, dennoch Bekämpfungsprogramme zu entwickeln, wenn aller Voraussicht nach Resistenzbildung vermieden werden kann (OGAWA et al., 1977).

2.2.1.2. Antibiotika gegen Krankheiten durch Bakterien und Pilze

Eine Kausaltherapie von Erkrankungen durch Bakterien und Pilze wurde bei Pflanzen erst nach Entdeckung und industrieller Herstellung von Antibiotika möglich.
Erste Erfolge wurden beim Versuch, den Erreger von "crown gall desease", Agrobacterium tumefaciens, mit Penicillin zu bekämpfen,im Jahre 1944 erzielt (BROWN und BOYLE, 1944).
Nach Informationen einer anderen Quelle (GOODMAN, 1980) datiert der Ersteinsatz von Antibiotika gegen Erreger bakterieller Pflanzenkrankheiten aus dem Jahre 1952, als nämlich Thiolutin mit Erfolg gegen "fire blight" angewandt wurde (MURNEEK, 1952). Seit Beginn der fünfziger Jahre wurden so ziemlich alle Antibiotika gegen verschiedene Erreger der Krankheiten durch Bakterien und Pilze ausprobiert, insgesamt gesehen allerdings mit wenig befriedigenden Ergebnissen (GOODMAN, 1962).
Trotzdem sind beim Studium der Literatur immer wieder Berichte zu finden, die das Gegenteil behaupten, insbesondere in den USA und in Japan, aber auch in Europa.
Als erstes Pflanzenbehandlungsmittel ist das Antibiotikum Streptomycin, das seit 1954 in den Birnenplantagen der Vereinigten Staaten von Amerika gegen "fire blight" massiv im Einsatz ist, in die Landwirtschaft eingeführt worden.
Von 1959 an ist Streptomycin auch in Japan gegen verschiedene bakterielle Erkrankungen von Obst und Gemüse erfolgreich angewandt worden (MISATO et al., 1976).
Gegen den Verderb durch "soft rot" bei für die Vermarktung abgepackten Spinatblättern wurden im speziellen Erfolge

mit Streptomycin-Sulfat erzielt (SMITH, 1955).
Insbesondere in Japan wurde "downy mildew" bei Zwiebeln und "shoot blight" bei Japanischen Lärchen mit diesem Antibiotikum erfolgreich bekämpft (MISATO et al., 1976).
Schon früher, nämlich seit 1955, wurden in Japan Tabakspflanzen, die von "wild fire" befallen waren, erfolgreich mit Streptomycin in der Dosis von 200 ppm behandelt (MISATO et al., 1976).
1954 wurde die Wirksamkeit von Helixin A, B und C, Antimycin A 35 und Crude Helixin gegen Brand bei Haferpflanzen, "wheat bunt" und "oat smute" in Gewächshaus- und Feldversuchen aufgezeigt (LEBEN et al., 1954).
Streptomycin ist ebenfalls wirksam gegen die gefürchtete "leaf blight" von Reispflanzen in Dosierungen von 200-500 ppm. Bei der Anwendung von mehr als 500 ppm zeigten sich phytotoxische Eigenschaften wie bleiche Flecken und niedrigere Erträge (MISATO et al., 1976).
Mischungen von Streptomycin-Sulfat und Eisenchlorid oder -citrat milderten die phytotoxischen Eigenschaften des Antibiotikums (MISATO et al., 1976).
Blasticidin S, 1958 als Stoffwechselprodukt von Streptomyces griseochromogenes isoliert, wurde als erstes Antibiotikum produziert, welches in Japan in der Landwirtschaft Bedeutung erlangen sollte. Das Salz, Benzylaminobenzen, wirksam gegen "rice blast", wurde in industriellem Maßstab für den Gebrauch in der Landwirtschaft hergestellt, da die Toxizität gegenüber der Pflanze als gering einzustufen ist (MISATO et al., 1976).
Seit 1965 wurde für die Bekämpfung von "rice blast" in Japan Kasugamycin eingesetzt, das bereits in Konzentrationen von 20 ppm wirksam ist. Es zeigt nicht die geringsten toxischen Wirkungen für Feldfrüchte und ist auch für Säugetiere sehr wenig giftig. Bis zum Auftreten von Resistenz

wurde ihm deshalb gegenüber Blasticidin S der Vorzug gegeben (MISATO et al., 1976).
In vitro- und in vivo-Versuche zur Bekämpfung des "crown gall bacterium" bei Tomatenpflanzen zeitigten Erfolge mit Terramycin, Aureomycin und Chloramphenicol in den Konzentrationen von 20, 50 und 125 µg/ml (KLEMMER, RIKER und ALLEN, 1955).
KRUGER (1960) berichtete über Versuche mit Antibiotika in Südafrika. Cycloheximide, Thiolutin, Oligomycin u.a. wurden getestet hinsichtlich ihrer Toxizität gegenüber Maissämlingen und ihrer Fähigkeit, Fäule, durch Diplodiaceae hervorgerufen, zu verhindern. Ferner wurde die Wirksamkeit der oben genannten Antibiotika gegen "sorgum kernel smut" ausprobiert.
KRUGER (1960) verzeichnete auch Erfolge bei der Bekämpfung von "tomato canker" in Südafrika. Dabei wurden die Wurzeln der Pflanzen 3-6 Stunden in Lösungen acht verschiedener Antibiotika (darunter Agrimycin, Penicillin G, Polymyxin B, Streptomycin und Terramycin) getaucht.
In vitro erwiesen sich Bacitracin und Albamycin am wirksamsten.
DEKKER (1963) hält "fire blight" bei Äpfeln und Birnen, verursacht durch Erwinia amylovora, für das wichtigste Anwendungsgebiet von Streptomycin.
Streptomycin fand auch COLE (1960) in Rhodesien als wirksamstes Antibiotikum in seinen Feldversuchen gegen "wild fire" und "angular leaf spot" bei Tabakspflanzen heraus. Oxytetracyclin, Neomycin und Chloramphenicol zeigten dagegen nicht entsprechende Erfolge.
Durchgreifende Effekte durch Senkung des Pseudomonas phaseolicola-Befalls bei Bohnen nach Behandlung mit Streptomycin, Terramycin und Tetracyclin, wobei der Befall bis zu 90% reduziert wurde, beschreibt NULTSCH (1959).

Aus England berichten GRIFFITH und PEVEGRINE (1960) von einer Senkung von "halo blight" an Haferpflanzen, hervorgerufen durch Pseudomonas coronafaciens bis zu 70 %, nach einer Beizung mit Streptomycin, Aureomycin, Agrimycin oder Terramycin in einer Dosierung von jeweils 200 ppm.
Die größere Wirksamkeit von Streptomycin gegen "fire blight" im Vergleich zu Kupfer- und Bordeaux-Brühe hebt DEKKER (1963) hervor und betont die Vermeidung von Fäulnisflecken bei Früchten.
Während Streptomycin in den USA schon ins Standard-Bekämpfungsprogramm gegen "fire blight" bei Äpfeln und Birnen und gegen "walnut blight" gehört, dürfte die Anwendung in Großbritannien für Birnenzüchter erst noch interessant werden (DEKKER, 1963).
Feldexperimente in England waren so überzeugend, daß ein großer Teil der Feldfruchtsamen für die Kultivierung im Jahr 1960 mit einer Streptomycin-Lösung behandelt wurde.
DEKKER (1963) beschreibt die erfolgreiche Beizung von Brokkoli- und Kohl-Samen mit Tetracyclin und die damit erreichte drastische Reduzierung der Infektion mit Xanthomonas campestris auf weniger als ein Prozent.
Von den Berichten aus neuerer Zeit verdienen die Folgenden erwähnt zu werden:
DUTTA und ISAAC (1981) bekämpften erfolgreich die "verticillium-Welke" an Tomatenpflanzen mit Streptomycin, Thiolutin, Bacitracin und Chloramphenicol. Cycloheximide stellten sich als zu toxisch heraus, um prophylaktischen oder therapeutischen Wert zu besitzen.
GREEN und NIENHAUS (1981) beschreiben die Wirkung von Penicillin und Tetracyclin auf die "latente Rosetten-Krankheit" der Zuckerrübe, für die man "RLO"-Organismen ätiologisch verantwortlich macht. Tetracyclin stellte sich

in seiner Wirkung dabei als zu phytotoxisch heraus. Die gleiche Dosis, nämlich 1000 ppm Penicillin wurde von den Pflanzen vertragen unter gleichzeitigem Rückgang der Krankheitssymptome.
CHUKWUNYEAKA (1980) untersuchte die Wirkung von Streptomycin und Oxytetracyclin auf die Sporenbildung von Drechslera oryzae bei Saatgut. Jeweils 100 ppm Zugabe des Antibiotikums hatten einen hohen Prozentsatz an Infektion mit Pilzen zur Folge, wahrscheinlich dadurch bedingt, daß alle antagonistisch wirkenden pathogenen Keime unterdrückt wurden, ein Phänomen, das auch von LIMONARD (1968) beobachtet worden ist.
Gegen die Baumwollbakteriose mit Xanthomonas malvacearum gingen NAYAK et al. (1976) unter anderem mit Antibiotika wie Streptomycin, Streptocyclin und Agrimycin 500 vor. MONDAL und MUKHERJEE(1978) testeten in einer umfangreichen Studie eine ganze Reihe phytopathogener Keime wie Xantomonas oryzae und Xanthomonas campestris, Pseudomonas solancearum und Bacillus polymyxa. Von 46 insgesamt eingesetzten Antibiotika waren Tetracyclin, Ampicillin, Streptomycin und Novobiocin am wirksamsten.

2.2.1.3. Antibiotika gegen Krankheiten durch Viren

Obwohl Antibiotika in einer ganzen Reihe von Fällen gegen Viruserkrankungen erprobt wurden, wie der folgende Tabellenauszug zeigt, waren die Mißerfolge weitaus häufiger, als gelegentliche, bescheidene Erfolge (ARUNKUMAR, 1976). Es gibt keine Standardmethode für die Bewertung der Anti-

biotika an erkrankten Pflanzen im Vergleich zu gesunden Pflanzen (Nullwert).
Cytovirin ist eines der weniger bekannten Antibiotika, von denen sich herausgestellt hat, daß sie eine gewisse antivirale Wirkung besitzen (THIRUMALACHAR, 1968).
Wie bei den viralen Infektionen der Tiere hat die Entwicklung antiviraler Antibiotika in der Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten noch nicht das Stadium erreicht, das erlauben würde, Empfehlungen für ihren Einsatz auszusprechen (THIRUMALACHAR, 1968).

Tabelle 1 (Auszug)

Antibiotika gegen Krankheiten durch Viren

Antibiotika	Virus	Referenz
Actidione (oder Cycloheximid)	"Broad bean bottle"	GIBBS und MACDONALD 1974
Actinomycin D	"Bromegrass mosaic"	KUMMERT und SEMAL 1971
Blasticidin S	Kartoffel Virus X	SHIMOMURA und OHASHI 1971
Chloramphenicol	Tabak Mosaik	SELA et al. 1969
Citrinin	Tabak Mosaik	YASUDA et al. 1971
Daunomycin	Tabak Tumor	MISRA und NIENHAUS 1977
Dextromycin	Tabak Mosaik	SHIMOMURA und HIRAI 1959
DPB(Kode-Name)	"Tomato leaf curl"	GOVINDU und THIRUMALACHAR 1973
Ferrimycin	Tabak Mosaik	SHIMOMURA und HIRAI 1959
Formycin	Tabak Mosaik	HUANG und MISATO 1970
Kanamycin	Tabak Mosaik	SHIMOMURA und HIRAI 1959
Laurisin	Tabak Mosaik	HUANG und MISATO 1970
Mitomycin C	Tabak Mosaik	HIRAI und SHIMOMURA 1960
Oligomycin	Kartoffel Virus X	YUN und HIRAI 1968
Puromycin	Tabak Mosaik	KATAOKA et al. 1969
Tetracyclin	Tabak Mosaik	SHIMOMURA und HIRAI 1959
Tubercidin	Tabak Tumor	MISRA und NIENHAUS 1977

aus: Thirumalachar, M. J., 1968

2.2.1.4. Art und Umfang der Anwendung

Es ist schwierig, Art und Umfang der als Pflanzenbehandlungsmittel verwendeten Antibiotika in Erfahrung zu bringen, da exakte Produktionsziffern von der Industrie als Betriebsgeheimnis gehütet werden (GOODMAN, 1980). Antibiotika in der Landwirtschaft von den USA und Japan und die jeweiligen Indikationen gibt Tabelle 2 wieder.

Tabelle 2

Daten über den Einsatz von Antibiotika in der Landwirtschaft

Land	Jahr des Einsatzes	Antibiotikum	Krankheiten od. andere Verw.	Angewandte Menge in t/Jahr	Kosten in DM
USA (THIRUMALACHAR, 1968)	1964	Allgemein	-Tierproduktion -Futterkonservierung -Pflanzenkrankheiten	26.000	
USA (GOODMAN, 1980)	1968	Streptomycin	-Pflanzenschutz	10	
		Tetracyclin	- "	10	
		Cycloheximid	- "	10	
		Blastidin S	-rice blast	10.000	
Japan (MISATO, 1976)	1974	Cycloheximide	onion downy mildew, blight of Japanese larch	17	300.000
		Griveseofulvin	Fusarium wilt of melon	2	40.000
		Blastidin S	Rice blast	1405	1.500.000
		Kasugamycin	Rice blast	8205	6.150.000
		Polyoxin	Pilzerkrankungen von Obst u.Gemüse	839	8.300.000
		Validamycin	Rice sheath blight	3987	5.500.000
		Streptomycin	Bakt. Erkrankungen von Obst u.Gemüse	349	5.800.000
		Chloramphenicol u. Kupfer	Rice leaf blight	10	280.000

2.2.2. Verwendung von Verbindungen mit Schwermetallen und Metalloiden wie Arsen

HUISINGH (1974) berichtet über den Einsatz von Schwermetallen im Pflanzenschutz und dessen Folgen. Der Einsatz von Blei und Quecksilber geht auf die Zeit vor Christus zurück. Schon 200 n. Chr. sprach sich Galen für ein generelles Quecksilberverbot im medizinischen Bereich wegen dessen Toxizität aus (GOLDWATER, 1971). Dagegen ist Cadmium vergleichsweise neu in der Liste der landwirtschaftlich nutzbaren Elemente.
Erst in den letzten 10 Jahren ist man wegen der weitverbreiteten Rückverteilung wachsender Mengen dieser Elemente in verschiedenen Ökosystemen nicht unbesorgt.

In einer von LAGERWERFF (1967) aufgestellten Liste von 280 verschiedenen Pestiziden enthalten 112 davon Schwermetalle und zwar in folgender Auflistung:

Pestizide insgesamt			220
darin enthalten	Schwermetalle		112
	nämlich	Hg	45
		Cu	28
		Zn	24
		Cd	13
		Mn	12
		Cr	7
		Sn	5
		Ni	4
		Fe	3
		Pb	1

An anderer Stelle ist auch Co als metallisches Element von Pflanzenbehandlungsmitteln erwähnt (HOFFMANN et al.,1976). Weltweit wurden jährlich 10 000 Tonnen Quecksilber produziert, zum landwirtschaftlichen Einsatz gelangten davon 500 Tonnen = 5% (GOLDWATER, 1971). Vergleichsweise dazu wurden 1978 weltweit nur noch 6000 Tonnen Quecksilber produziert(DIERCKE Weltstatistik 80/81), dtv). HUISINGH (1974) erwähnt die Toleranzmechanismen von Organismen gegenüber Schwermetallen und stellt die Forderung auf, in Zukunft Felfruchtgenotypen auch nach Metalltoleranz zu selektieren, wie das zur Zeit gegen Krankheiten, Insekten, Dürre und Frost geschieht.
BEWLEY (1980) untersuchte einerseits den Einfluß von Schwermetallen auf die Mikroflora der Blattoberfläche auf Blättern von Eichen, andererseits auf jungen Eichensämlingen. Er unterschied dabei Proben, die aus der Nähe einer Gießerei mit entsprechend hoher Schwermetallemission gewonnen waren mit solchen, die künstlich mit Lösungen von Zink, Blei und Cadmium besprüht worden waren, und unbehandelte Kontrollgruppen. Dabei kam er zu dem Ergebnis, daß die Belastungskapazität der Mikroflora gegenüber Schwermetallionen generell recht hoch ist; er stellte aber eine wesentlich höhere Toleranz bei Pilzen fest, als bei Bakterien.
PRZYBYL (1979) isolierte Bakterien der Genera Bacillus, Pseudomonas, Erwinia u.a. von der Rindenoberfläche von Pappeln, deren Standorte Grünanlagen von Industriegebieten mit hoher Schwermetallemission waren. Deren qualitative und quantitative Zusammensetzung richtete sich danach , wie resistent sich die Pappeln gegenüber dem hohen Meßwert an Schwermetallen verhielten. Sie konnte aber keinen bestimmten Erreger isolieren, der gewissermaßen als Indikatorkeim der Verschmutzungsquelle hätte dienen können,

wie das für Pseudomonadaceae angenommen wurde, die von Luzerne- und Zuckerrübenblättern aus der Verschmutzungszone von Kupferwerken zu isolieren waren.
BEWLEY (1978) zeigte bei einer anderen Untersuchung den Einfluß von Blei-, Cadmium- und Zinkverschmutzungen auf die Mikroflora der Blattoberfläche von deutschem Weidelgras (Lolium perenneas). Die Gehalte der Schwermetalle entsprechen denen früherer Untersuchungen von BURKITT et al. (1972). BEWLEY (1978) stellte besonders bei Bakterien eine höhere Toleranz im Feld als in vitro fest. Insgesamt zeigt seine Studie, daß alle Populationen von Mikroorganismen auf der Blattoberfläche überraschend wenig durch zum Teil recht hohe Grade an Schwermetallverschmutzung beeinflußt wurden.
LITTLE (1973) untersuchte die Verschmutzung mit verschiedenen Schwermetallen von Blattoberflächen an Ulmen, Eichen und Weiden. Die sehr geringen Mengen, die er durch seine Wasch- und Extraktionsmethoden isolierte, ließen ihn zu dem Schluß kommen, daß kaum irgendein Metall innerhalb des Laubes in einem Ausmaß persistiert, daß es zu Stoffwechselvergiftungen führen könnte. Die Mikroflora von Pinien und Kohl, vergleichsweise aus einem kontaminierten und einem nicht betroffenen Gebiet einander gegenübergestellt, ergab sowohl eine beträchtliche Reduzierung der Mikroflora, besonders der pigmentierten Bakterien und Hefen, als auch eine größere Toleranz gegenüber Schwermetallen in künstlichen Wachstumsmedien bei Vorliegen kontaminierter Proben (GINGELL et al., 1976).
In einer weiteren Untersuchung beschreiben BEWLEY und CAMPBELL (1980) die Wirkung von Zink-, Blei- und Cadmium-Kontaminationen auf die Mikroflora von Hagedornblättern. Dabei ermittelten sie eine nur leichte Reduktion der Bakterien beim Einsatz aller drei metallischen Elemente,aber eine hochgradig

negative Korrelation der Gesamtkeimzahl unter dem Einfluß von Blei. Im Gegensatz dazu zeigten Aureobasidium pullulans und nicht-pigmentierte Hefen teilweise eine positive Korrelation mit Blei, wurden aber gehemmt durch Zink und/oder Cadmium.
Zink in Konzentrationen von 30 mg/l bewirkt beispielsweise bei Fusarium oxysporum, wenn der Pilz die Baumwollpflanze befällt, durch eine Aktivierung des Dehydrogenasesystems, daß der Pilz noch nicht abstirbt, aber seine Virulenz gegenüber dem Wirt verliert (KARTHASHOVA und GORJACHER, 1983). Die als hoch anzusehende Zinkmenge wirkte sich dabei nicht negativ auf die Wirtspflanze aus.
Von allen Salzen, die ein metallisches Element aufweisen, haben allerdings lediglich die Kupferverbindungen die größte Bedeutung erlangt. Ihnen ist eine besondere Wirkung gegenüber Pilzen als Krankheitserregern zuzuschreiben. Während in früheren Jahrzehnten vornehmlich Bordeauxbrühe $(Ca(OH)_2)_3 \cdot CuSO_4$, aber auch Kupfercarbonat oder -malachit $Cu(OH)_2 \cdot CuCO_3$ und Kupferammoniumcarbonat $Cu(NH_3)_2$ (Chasnut compound) Verwendung fanden, werden in neuerer Zeit fast ausschließlich Handelspräparate auf der Basis von Kupferchlorid, $CuCl_2 \cdot 2\ H_2O$, oder Kupferhydroxid, $Cu(OH)_2$ verwendet (HOFFMANN et al., 1976).

Sie werden gegen Mehltaupilze an Kartoffel und Tomate, Hopfen, an Gemüse und Zierpflanzen, gegen Schorf an Kernobst, die Pfirsich-Kräusel-Krankheit und verschiedene Blattflechtenerreger eingesetzt. Kupferstäubemittel können Kupferspritzmittel nicht ersetzen, da sie geringere Haftfähigkeit aufweisen, doch vermögen sie bei ungünstiger Witterung eine Ergänzung darzustellen.
Zur Anwendung kommen basische Kupferderivate in fein verteilter Form, deren Schädigung durch Zugabe von Kalk

gemildert wird, sogenannte Kupferkalkstäube, die nur bei frischem Laub ausgebracht werden sollten.
Etliche Kupferverbindungen sind bereits in sehr niedrigen Konzentrationen fungizid. Zur Erklärung der Kupferwirkung auf Pilze wird vermutet, daß aus den relativ unlöslichen und damit auch nicht phytotoxischen Kupferfungiziden lösliches Metall abgegeben wird, wobei biogene Faktoren mitwirken können.
Gegen Schadinsekten wurde Kupfer auch als Streufutter früh eingesetzt(Kupferarsenit + Kupferacetat).
Arsen fand dagegen auch in Verbindung mit Blei als Bleiarsenat oder auch als Kalkarsenat eine Anwendung bei der Pflanze. Jedoch liegt dies schon Jahrzehnte zurück. Arsen und Quecksilber-haltige Verbindungen wurden 1710 als Beizmittel für Saatgut angeführt, 1720 erfolgte die erstmalige Anwendung von Kupfersulfat als Beizmittel (HOFFMANN et al., 1976).
Bis heute wird Kupfersulfat breit eingesetzt, sogar auch als Therapeutikum bei landwirtschaftlichen Nutztieren (Kalb, Schwein) und als Wachstumsförderer beim Schwein (GEDEK, 1981a, SIEBERT, 1982), während für die Anwendung von Arsen- und Quecksilber-haltigen Verbindungen sowie für einige andere Salze mit metallischen Elementen zumindest in der Bundesrepublik Deutschland mittlerweile Verbote ausgesprochen worden sind (siehe Kap. 2.2.3).

2.2.3. Rechtliche Situation in der Bundesrepublik Deutschland

Der Umgang mit Pflanzenbehandlungsmitteln ist in der BRD durch das Pflanzenschutzgesetz (Neufassung vom 2.10.1975) und durch die Pflanzenschutz-Anwendungsverordnung geregelt.
Pflanzenschutzmittel im Sinne dieses Gesetzes sind nach § 2:
"Stoffe, die dazu bestimmt sind, Pflanzen vor Schadorganismen oder Krankheiten oder Pflanzenerzeugnisse vor Schadstoffen zu schützen; ausgenommen sind Wasser, Düngemittel im Sinne des Düngemittelgesetzes und Stoffe, die dazu bestimmt sind, die Widerstandsfähigkeit von Pflanzen gegen Schadstofforganismen oder Krankheiten zu erhöhen, ohne toxisch zu wirken".
Die Einführung in die BRD und den innerländischen Verkehr regelt § 7:
"Pflanzenbehandlungsmittel dürfen nur eingeführt oder gewerbsmäßig vertrieben werden, wenn sie von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (Biologische Bundesanstalt) in Braunschweig zugelassen sind".
Die Bedingungen der Zulassung eines Pflanzenschutzmittels nennt § 8:
"Die Zulassung wird nach Prüfung des Pflanzenbehandlungsmittels erteilt, wenn .....
3. das Pflanzenbehandlungsmittel bei bestimmungsgemäßer und sachgerechter Anwendung keine schädlichen Auswirkungen hat, die nach dem Stand der wissenschaftlichen Erkenntnisse nicht vertretbar sind".

§ 9: "Die Zulassung endet zehn Jahre nach Ablauf des Jahres, in dem sie erteilt wurde; sie kann erneut erteilt werden. Im Einzelfall kann eine kürzere Zulassungsdauer festgesetzt werden".
§ 10 (2): "Die Zulassung von Pflanzenbehandlungsmitteln sowie die Rücknahme und der Widerruf der Zulassung sind im Bundesanzeiger bekannt zu machen".
Die Pflanzenschutz-Anwendungsverordnung vom 19.12.1980 nennt in ihrer Anlage 1 Stoffe, deren Anwendung als Pflanzenbehandlungsmittel verboten sind ...
"In Verbindung mit Anlage 1 Nr. 20 dürfen Pflanzenbehandlungsmittel, die aus organischen Quecksilberverbindungen bestehen oder organische Quecksilberverbindungen enthalten, zur Behandlung von Getreidesaatgut außer Mais bis zum 30.April 1982 angewandt werden".
Die Anlagen 2 und 3 dieser VO zählen Stoffe auf, deren Einsatz als Pflanzenbehandlungsmittel beschränkt ist. Die Beschränkungen und behördlich genehmigten Anwendungsmöglichkeiten sind dort für jeden Stoff im einzelnen aufgeführt.
Siehe hierzu Tabelle 3.

Obwohl die Anwendung von Antibiotika zur Bekämpfung oder Verhütung von Pflanzenkrankheiten in der Bundesrepublik Deutschland generell verboten ist, findet man vereinzelt in der Literatur Berichte über einen solchen Einsatz nach Genehmigung durch die Biologische Bundesanstalt in Braunschweig.
KNÖSEL und THILL(1966) berichten über einen starken Befall an Kirschbäumen mit Pseudomonas syringae. Beim probeweisen Einsatz von Streptomycin, Oxytetracyclin und Penicillin waren die beiden erstgenannten gleichermaßen wirksam.

Tabelle 3

Auszug aus der VO über Anwendungsverbote und -beschränkungen für Pflanzenbehandlungsmittel

- Pflanzenschutzmittel, die Metallionen enthalten -

a) Anwendungsverbote
- Quecksilberverbindungen
- Selenverbindungen
- Bleiverbindungen
- Cadmiumverbindungen
- Arsenverbindungen[1)]

b) Anwendungsbeschränkungen:	Anwendung nur zulässig
- Metallphosphide (Phosphorwasserstoff entwickelnde Verbindungen, ausgenommen rodentizide Ködermittel; Zinkphosphid)	zur Begasung 1. in Lagerräumen, Vorratsräumen, Silozellen ... .,;nur mit Zustimmung der zuständigen Behörde 2. gegen Mäuse im Boden, gegen den Hamster und den Maulwurf

c) Beschränkte Anwendungsverbote:	Anwendung verboten
- Thalliumsulfat	als Getreideköder in der Form des offenen Ausbringen
- Zinkphosphid	als Getreideköder in der Form des offenen Ausbringen

1) Arsen gilt "als typisches Übergangselement, das metallische und nicht metallische Züge aufweist".
Hermann Römpp, Chemie-Lexikon, 5.Aufl. 1962 Bd. I S. 327

KNÖSEL und CORNILLS (1980) testeten die Wirksamkeit von Streptomycin, Oxytetracyclin und Kasugamycin gegen den Erreger des "Feuerbrandes" (Erwinia amylovora) bei Cotoneaster spezies im Gewächshausversuch. Dabei heben sie die Widerstandsfähigkeit der Wirtspflanze als entscheidenden Faktor hervor und räumen lediglich einer prophylaktischen Anwendung Chancen in der Praxis ein.

2.3. Auftreten von Resistenz gegenüber Pflanzenbehandlungsmitteln auf Pflanzen vorkommender Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae

Resistenz gegen Streptomycin wurde schon vor 1953 festgestellt. Die Kombination von Streptomycin und Oxytetracyclin zeigt, daß sich die Resistenz von Streptomycinresistenten Erwinia- und Xanthomonaslinien umgehen oder mindestens aufschieben ließ. Alleiniger Gebrauch von Streptomycin hatte zu häufiger Resistenz bei der Bekämpfung von Erwinia amylovora auf Birnen in den Weststaaten der USA geführt (GOODMAN, 1980).
Streptomycin-Resistenz findet ebenfalls Erwähnung bei Pseudomonas-Erkrankungen an Tabakspflanzen, Maulbeerbäumen und Sellerie (OGAWA et al., 1976).
Blasticidin S, Kasugamycin und Polyoxin leisteten jahrelang gute Dienste, bis auch bei ihnen Resistenz auftrat (OGAWA et al., 1977).
DYE (1958) hatte im Experiment an Pfirsichsämlingen Streptomycin-Resistenz nachgewiesen. Das gleiche Ergebnis erzielten THAYER und STALL (1961) bei der Verwendung von Streptomycin gegen den Befall von Tomaten- und Pfefferpflanzen mit Xanthomonas vesicatoria.
OGAWA et al. (1976) berichten von Streptomycin-resistenten Linien von Pseudomonas-, Erwinia- und Xanthomonas-Spezies in den siebziger Jahren bei verschiedenen Pflanzenkrankheiten. Sie weisen ferner darauf hin, daß trotz einer größeren Anzahl von Publikationen, die sich mit "fire blight" und seiner Bekämpfung befassen, der wichtige Aspekt der Toleranzbildung über 20 Jahre lang so gut wie übersehen wurde. Ein vergleichbares Beispiel von Strepto-

mycin-Toleranz trat bei bakteriellem "leaf spot" von Tomaten-Pflanzen (Xanthomonas vesicatoria) in Südflorida auf.
OGAWA et al. (1976) weisen auch auf die Gefahr der Resistenzsteigerung durch Import resistenter Linien aus dem Ausland hin und führen als Beispiel die Einfuhr resistenter Penicillin-Linien bei Blumenzwiebeln an. Sie fanden aber keinen Hinweis auf Mißerfolge bei der Anwendung von Kombinationspräparaten zweier Antibiotika beim Auftreten Streptomycin-resistenter Linien.
Antibiotika spielen trotz der mitunter auftretenden Resistenz in der Krankheitsbekämpfung von Pflanzen eine große Rolle, besonders dort, wo die Phytotoxizität von Metallverbindungen deren Einsatz begrenzt (OGAWA et al., 1977).
Außerdem lassen epidemiologische Studien den Schluß zu, daß sich Resistenz bei bestimmten Keimen, auf bestimmten Pflanzen, an bestimmten Orten nicht entwickelte, zumindest nicht zu finden war.
Im Plant Protection Bulletin der FAO, Nr.3 vom Jahr 1977 geben OGAWA et al. (1977) 113 allgemeine Fungizide und Bakterizide an, von denen im Laufe der Zeit 34 Resistenz im Laboratorium oder im Feld aufwiesen. Die folgende Tabelle 4 zeigt Beispiele der dort erwähnten Erreger, die sich gegenüber bestimmten Antibiotika als resistent erwiesen haben. Die dafür verantwortlichen Resistenzdeterminanten können sich bei den pflanzenpathogenen Arten ebenso auf Plasmiden befinden, wie bei den Erregern von Infektionskrankheiten bei Mensch und Tier.
LACY (1978) stellte genetische Studien mit dem Plasmid RP 1 bei Erwinia chrysanthemii-Linien auf Mais an, das er von Escherichia coli-Stämmen übertrug. Die Transkonjugate wurden resistent gegen Carbenicillin, Neomycin und

Tabelle 4

Beispiele für Erreger mit Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika

Antibiotika	Erreger	Nachweis von Resistenz	Referenz
Antimycin A	Ventura inaequalis	Laborbedingungen	LEBEN et al., 1955
Blasticidin S	Pyricularia oryzae	Labor- und Feldbedingungen: Reis	NAKAMURA et al., 1968 UESUGI et al., 1971
Kasugamycin	Pyricularia oryzae	Labor- und Feldbedingungen: Reis	OHMORI et al., 1968 MIURA et al., 1973
Polyoxin	Alternaria kikuchiana Alternaria mali	Feldbedingungen: Äpfel/Birnen	IIDA, 1975
	Botrytis cinerea	Erdbeeren	IIDA, 1975
Streptomycin	Pseudomonas tabaci	Feldbedingungen:	COLE, 1960
		Tabakspflanzen	IIDA, 1975
	Pseudomonas mori	Maulbeeren	IIDA, 1975
	Pseudomonas syringae	Pfirsiche	DYE, 1958
	Erwinia amylovora	Birnen	SCHROTH et al., 1969
Streptomycin + Oxytetracyclin	Erwinia amylovora	Laborbedingungen	ENGLISH et al., 1954
	Xanthomonas vesicatoria	Laborbedingungen	ENGLISH et al., 1954

Auszug aus einer Tabelle nach OGAWA et al., 1977

Tetracyclin und wurden außerdem empfindlich gegenüber der Lysis durch plasmidspezifische Phagen.
Die Beständigkeit von Plasmiden, die Antibiotikaresistenz in Xanthomonas vesicatoria auf Tomatenblättern verursachen, beschrieben LAI et al. (1977).
Dabei wurde gezeigt, daß die epidemiologische, bedeutsame Stabilität von R-Plasmiden in pflanzenpathogenen Bakterien nicht vorhersagbar ist, aufgrund ihrer Beständigkeit in Kulturmedien.
Es war zum Beispiel die Stabilität der Plasmide unter "normalen" Fäulnisbedingungen länger nachweisbar, als wenn die Bakterien bei niedrigen Temperaturen auf schiefen Ebenen gehalten wurden.
COPLIN (1978) beschreibt die Eigenschaften zweier R-Plasmide, u.a. ihre Übertragung von Escherichia coli auf Erwinia stuartii. Die Übertragung von R-Plasmiden innerhalb von Xanthomonas Spezies und auf Pseudomonasarten, Erwinia chrysanthemii und Agrobacterium tumefaciens, nicht aber auf Corynebakterien, erwähnen LAI et al. (1977).
PANOPOULOS et al.(1974) gelang die konjugative Übertragung der R-Faktoren von Pseudomonas aeruginosa auf pflanzenpathogene Pseudomonas Spezies, wie Pseudomonas syringae.
Eine exakte Beschreibung der Merkmale der Plasmide, die in pflanzenpathogenen Pseudomonadaceae, wie P. tabaci, P. angulata und P. coronafaciens vorkommen, legen PIWOWARSKI und SHAW (1981) vor.
Grundsätzlich sind bei den auf Pflanzen vorkommenden Bakterien die gleichen Plasmide zu erwarten wie bei Keimen des Menschen und von Tieren, insbesondere, was die gramnegativen Spezies anbelangt. Sie übertragen ihre Eigenschaften auch auf andere Arten via Konjugation, die

bei grampositiven Keimen gegenüber der Transduktion eine untergeordnete Rolle spielen soll (GEDEK, 1981 b).

Über die plasmid-codierte Resistenz bei Arten, die als Krankheitserreger bei Mensch und Tier vorkommen, aber teilweise auch in der freien Natur anzutreffen sind, informiert Tabelle 5.
Dieser Tabelle ist zu entnehmen, daß R-Faktoren bei den gramnegativen Arten am häufigsten innerhalb der Familie Enterobacteriaceae und bei Pseudomonas aeruginosa auftreten (JACOBY und SWARTZ, 1980).
Neben den Plasmiden, die Resistenz gegenüber Antibiotika codieren, können sich auch solche in diesen Bakterien finden, die für eine Resistenz gegenüber Metallionen verantwortlich sind (JACOBY und SWARTZ, 1980).

Tabelle 5

Auffindung von Plasmid-codierter Antibiotika-Resistenz in bakteriellen Krankheitserregern*

Keime	Antibiotika									
	Beta-lactam	C	G	K	MLS	S	Su	T	Tm	Tp
Gram-negativ										
Enterobacteriaceae	+	+	+	+		+	+	+	+	+
Haemophilus influencae	+	+		+				+		
Neisseria gonorrhoeae	+									
Pseudomonas aeruginosa	+	+	+	+		+	+	+	+	
Gram-positiv										
Staphylococcus aureus	+	+	+	+	+	+		+	+	
Staphylococcus epidermidis	+	+		+				+	+	
Streptococcus										
Gruppe A					+					
Gruppe B		+			+			+		
Gruppe D		+		+	+	+		+		
Anaerobier										
Clostridium perfringens		+			+			+		
Bacteroides fragilis	+	+			+			+		

Abkürzungen: Beta-lactam-Antibiotika, Penicilline und Cephalosporine; C, Chloramphenicol; G, Gentamicin; K, Kanamycin; MLS, Makrolid-Antibiotika (Erythromycin, Lincomycin und Streptogramin Typ B); S, Streptomycin; Su, Sulfonamid; T, Tetracyclin; Tm, Tobramycin; Tp, Trimethoprim

* Tabelle nach JACOBY und SWARTZ, 1980

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Material und Proben

3.1.1. Anzahl der Proben und Art der untersuchten Futtermittel

Zur Untersuchung kamen Körnerfutter von Hafer, Gerste und Weizen, Schrote sowie Mischfutter als Mehl und in Form von Pellets. Die Proben waren im Laufe der Jahre 1980 und 1981 von verschiedenen Futtermittelherstellern und Tierärzten dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin am Tierärztlichen Fachbereich der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Kontrolle des Frischezustandes eingesandt worden. Von diesen Proben wurde jeweils eine bestimmte Menge abgezweigt und auf die auf Pflanzen vorkommenden Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae hin untersucht.
Die Tabelle 6 gibt einen Überblick über das Untersuchungsmaterial, aufgeschlüsselt nach Art der Futtermittel, Anzahl der Proben und das jeweils angewandte Untersuchungsverfahren.

Tabelle 6

Untersuchungsmaterial	a) Anzucht der Keime auf festen Selektiv-Nährböden		b) Anzucht der Keime auf flüssigen Selektiv-Nährböden	
	Futtermittel	Anzahl der untersuchten Proben	Futtermittel	Anzahl der untersuchten Proben
	Einzelfuttermittel			
	WEIZEN	12	WEIZEN	1
	HAFER	14	HAFER	10
	GERSTE	15	GERSTE	4
	SCHROT	6	SCHROT	2
	Mischfuttermittel			
	MEHL	5	MEHL	17
			PELLETS	5
	insgesamt	52	insgesamt	39

3.1.2. Selektive Anzucht der in Futtermitteln vorkommenden Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae

3.1.2.1. Verfahren mit quantitativer Erfassung der jeweiligen Keimgehalte

Von jeder Futtermittelprobe wurde 10 g Material abgewogen und im sterilen Mörser in wenigen Milliliter einer Pepton-Kochsalz-Lösung (0,1 % Pepton und 0,85 % NaCl) 10 Minuten lang eingeweicht, sofern es sich um Getreidekörner handelte und anschließend zerkleinert. Unter Wahrung der Sterilität erfolgte dann eine Überführung in eine 250 ml Schraubflasche mit 90 ml Pepton-Kochsalz-Lösung (abzüglich der zum Einweichen verwendeten Milliliter). Nach einer Schüttelzeit von 20 Minuten wurden weitere Verdünnungen im Verhältnis 1 : 10 hergestellt. Von 3 Verdünnungsstufen - in der Regel 10^{-2}, 10^{-3} und 10^{-4} wurden jeweils 0,1 ml auf der Oberfläche von Violet Red Bile Agar (OXOID, Nr. CM 107)-Platten ausgespatelt, die folgende Zusätze als Selektor erhielten:

1.*	$CuSO_4 \times 5\ H_2O$	entsprechend	200 mg/l Cu^{2+}
2.*	$ZnSO_4 \times 7\ H_2O$	entsprechend	200 mg/l Zn^{2+}
3.*	As_2O_3	entsprechend	200 mg/l As^{3+}
4.	Streptomycin		20 mg/l
5.	Chloramphenicol		20 mg/l

Agarplatten ohne derartigen Zusatz dienten der Erfassung derjenigen gramnegativen Stäbchenbakterien ohne Resistenz

---

1.* Kupfer-II-sulfat (RIEDEL DE HAEN, Nr. 30595)
2.* Zinksulfat (MERCK, Nr. 8883)
3.* Arsentrioxid (MERCK, Nr. 119)

gegenüber den ausgewählten Antibiotika resp. Metallionen. Die Agarplatten wurden zunächst 24 Stunden lang bei 37°C, danach 3 Tage bei Zimmertemperatur bebrütet; die Auswertung erfolgte am 4. Tag.
Eine Keimzahlbestimmung wurde für alle Zusätze gesondert vorgenommen. Ausgezählt wurden alle Agarplatten, die zwischen 20 und 200 Kolonien aufwiesen. Das Ergebnis wurde anschließend mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Keimzahlen wurden logarithmiert und dafür der Logarithmus 10 verwendet. Damit ist es möglich, eine Keimzahl von z.B. $6,0 \times 10^4$ als log 4,8 auszudrücken. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß sich die Ergebnisse besser darstellen und die Einzelwerte gegebenenfalls zur Berechnung von Mittelwerten auch leichter addieren lassen. Keimzahlen von weniger als 2×10^3 wurden demzufolge als $\log < 3,3$, solche von mehr als 2×10^6 als $\log > 6,3$ ausgedrückt. Wenn derartige Werte mehrfach vorkamen, ließen sich keine Mittelwerte für die untersuchten Proben ausrechnen, stattdessen wurden dann log 10-Bereiche angegeben.

3.1.2.2. Verfahren zur qualitativen Erfassung vornehmlich von Keimen mit Resistenz gegenüber Metallionen

Bei Verwendung dieses Verfahrens erfolgte eine Vorkultur in einem flüssigen Medium, welches bestimmte Zusätze enthielt. Von jeder Futterprobe wurden dabei 5 x 10 g Futtermittel abgewogen und das Material unter sterilen Bedingungen in jeweils 5 Schraubflaschen mit 100 ml Brilliant Green

Broth (OXOID, Nr. CM 31) überführt. Zuvor war der Brilliant Green Broth jeweils eine der nachstehenden Salzverbindungen in entsprechender dazu berechneter Metallionenkonzentration zugesetzt worden:

1.* $CuSO_4 \times 5\ H_2O$ entsprechend 200 mg/l Cu^{2+}
2.* $Co(No_5)_2 \times 6\ H_2O$ entsprechend 100 mg/l Co^{2+}
3.* $Hg(NO_3)_2$ entsprechend 250 mg/l Hg^{2+}
4.* As_2O_3 entsprechend 200 mg/l As^{3+}
5.* $Pb(NO_3)_2$ entsprechend 500 mg/l Pb^{3+}

Die Flaschen wurden 24 Stunden lang bei 32° bebrütet. Anschließend wurden Verdünnungsreihen angelegt und zwar beim Zusatz mit Hg^{2+}-Ionen Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-4}, bei den übrigen Metallzusätzen Verdünnungen von 10^{-3} bis 10^{-5}. Zur Verdünnung wurde sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet. Anschließend wurden je 0,1 ml auf Violet Red Bile Agar ohne Zusätze ausgespatelt und die Platten wie bei Anwendung des ersten Verfahrens zunächst 24 Stunden bei 32° C und 3 Tage bei Zimmertemperatur bebrütet.

1.* Kupfer-II-sulfat (RIEDEL DE HAEN, Nr. 30595)
2.* Kobalt-II-nitrat (MERCK, Nr. 119)
3.* Quecksilber-II-nitrat-1-hydrat (MERCK, Nr. 4439)
4.* Arsentrioxid (MERCK, Nr. 119)
5.* Blei-II-nitrat (MERCK, Nr. 7396)

3.1.3. Isolierung von Enterobacteriaceae, insbesondere der KES-Gruppe sowie von Pseudomonadaceae

Die Isolierung der Keime, die anschließend auf ihre Ansprechbarkeit gegenüber einer Auswahl von Antibiotika getestet werden sollten, erfolgte jeweils nach Entwicklung

charakteristischer Kolonien auf Violet Red Bile Agar. Es wurden nur rote oder violett-rote Kolonien isoliert und diese durch Anlegen eines Verdünnungsausstriches auf Lactose-Indikator-Agar nach GASSNER(OXOID ,Nr. CM 1002) auf Reinheit überprüft (ROLLE und MAYR, 1978).
Bei nicht klar abgegrenztem Wachstum auf Violet Red Bile Agar wurde ein Drei-Ösen-Strich angefertigt. Nach Bebrütung der Platten über 24 Stunden bei 37° C wurden die Keime nur dann in Bezug auf ihre Resistenzeigenschaften gegenüber Antibiotika geprüft, wenn sie die dem Nährboden zugesetzte Lactose abbauten.
Damit war gewährleistet, daß nur Arten in die Testung einbezogen wurden, die in der Darmflora von Mensch und Tier vorkommen und bei diesen gelegentlich auch eine Krankheit hervorrufen können.

3.1.4. Identifizierung der isolierten gramnegativen Stäbchenbakterien

Mit den auf GASSNER-Nährböden reingezüchteten, Lactose-positiven Keimen wurde zunächst der Oxidase-Test mit Anilin-Oxalat-Oxidase (SERVA, Nr. 12740) durchgeführt, um die Cytochromoxidase-negativen Enterobacteriaceae abzutrennen.
Beim Oxidase-Test wird weißes Filterpapier mit ein paar Tropfen des Reagenzes getränkt; auf diesem angefeuchteten Filterpapier wird dann mit der sterilen Öse etwas keimhaltiges Material verrieben. Das Reagenz, bei negativer

Reaktion hellrosa bleibend, färbt sich bei positiver Reaktion sofort intensiv dunkelrot-violett.
Die sich negativ verhaltenden Keime wurden zur weiteren Differenzierung auf das "Enterotube II^{R}, Roche", überimpft. Dabei handelt es sich um ein Teströhrchen mit 12 Kammern, in dem 15 verschiedene Merkmale biochemischer Eigenschaften des Keimes auf einmal geprüft werden können. Alle Kammern werden in einem Arbeitsgang gleichzeitig beimpft. Nach 24-stündiger Bebrütung bei 32° C, weil es sich um Keime aus Futtermitteln handelte, wurde das Testergebnis für folgende Reaktionen abgelesen:

Kammer	Substrat	Nachweis
1	Glucose	Glucosespaltung mit und ohne Gasproduktion
2	Lysin	Lysindecarboxylase
3	Ornithin	Ornithindecarboxylase
4	Tryptophan	H_2S-Bildung/Indolbildung
5	Adonit	Adonitspaltung
6	Lactose	Lactosespaltung
7	Arabinose	Arabinosespaltung
8	Sorbit	Sorbitspaltung
9	Voges-Proskauer	Bildung von Acetylmethylcarbinol (Acetoin)
10	Dulcit/ Phenylalanin	Dulcitspaltung/ Phenylalanindesaminase
11	Urea	Harnstoffspaltung
12	Citrat	Citratverwertung

Die positiven bzw. negativen Reaktionen eines solchen Tests, bewertet mit Zahlen, ergeben eine Code-Nummer, mit deren Hilfe nach dem Computer-Codier-und Identifikationssystem für Enterotube II in den meisten Fällen

die Artzugehörigkeit des geprüften Keimes ermittelt werden kann.

3.1.5. Empfindlichkeitsprüfung der Isolate gegenüber Antibiotika und synthetischen Chemotherapeutika

3.1.5.1. Durchführung des Plattendiffusionsverfahrens

Mit der abgeflammten Öse wurde von auf den GASSNER-Platten gewachsenen Kolonien eine Einzelkolonie in 5 ml sterile Standard-I-Boullion (MERCK,Nr. 7882) überimpft. Die Boullionröhrchen wurden 24 Stunden lang bei 32° C bebrütet. Anschließend wurde die bewachsene Boullion im Verhältnis 1 : 1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und eine Öse (= 20 µl) auf der Oberfläche einer Iso-Sensitest-Agar-Platte (OXOID,Nr. CM 471) ausgespatelt.
Mittels eines Dispensors wurden dann 6 Antibiotika-Testplättchen pro Platte aufgetragen, ein weiteres Plättchen wurde mit einer sterilen Pinzette in die Mitte der Platte gelegt. Jede Testplatte wurde zunächst eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen und anschließend 24 Stunden bei 32°C bebrütet. Nach der Bebrütungszeit wurden von den getesten Antibiotika bzw. synthetischen Chemotherapeutika die Hemmhofdurchmesser ermittelt und tabellarisch festgehalten. Die Keime, deren Anzucht mit festen Selektivnährböden vorgenommen worden war, wurden gegenüber sieben, die mit flüssigen,selektiv vorkultivierten Keime gegenüber 14 verschiedenen Chemotherapeutika getestet.

3.1.5.2. Interpretation der Antibiogramme

Über die Chemotherapeutika gibt Tabelle 7 Aufschluß, welcher zugleich die Bewertung sensibel (S), mäßig sensibel (MS) und resistent (R) entnommen werden kann.

Tabelle 7

Interpretation der Hemmhöfe unter Zugrundelegung der Bewertungsgrenzen nach NCCLS bzw. DIN

Antibiotikum bzw. Chemotherapeutikum		Symbol* und Beladung pro disc in µg bzw. E	Hemmhofdurchmesser in mm		
			R ≤	MS ≥ ≤	S ≥
Testplatte 1	Tetracyclin	T 30	18	19-23	24
	Streptomycin	S 10	14	15-16	17
	Chloramphenicol	C 30	16	17-20	21
	Ampicillin	A 10	10	11-20	21
	Kanamycin	K 5	6		7
	Sulfonamid	Su 100	10	11-19	20
	Furazolidon	Fu 50	16		17
Testplatte 2	Amicacin	Ak 30	10	11-17	18
	Gentamicin	G 30	17		18
	Spektinomycin	Sp 30	14	15-16	17
	Carbenicillin	Cb 100	11	12-19	20
	Cephalotin	Ce 30	17	18-19	20
	Polymyxin B	Po 300	13		14
	Nalidixinsäure	Nx 30	13		14

*nach WHO, 1978

3.2. ERGEBNISSE UND DEREN BESPRECHUNG

3.2.1. Ergebnisse des Verfahrens mit quantitativer Erfassung der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae

3.2.1.1. Keimgehalt der Futtermittel ohne Zusatz eines Chemoresistenz selektierenden Agens

Die Keimzahlen, in denen gramnegative Stäbchenbakterien auf Violet Red Bile Agar ohne Zusatz eines auf Chemoresistenz selektierenden Agens nachweisbar waren, können der Tabelle 8 und der Abbildung 1 entnommen werden. Ährengetreide, wenn es als Ganzkorn zur Untersuchung eingeschickt wurde, erwies sich allgemein als weniger mit gramnegativen Stäbchenbakterien kontaminiert, insofern es sich dabei um Weizen handelte. Hafer und Gerste waren dagegen weitaus höher kontaminiert. Bei zwei Drittel der Proben lag der Keimgehalt im $\log_{10}$-Bereich von 4,6 - 6,3/g Futtermittel. Bei Gerste erreichten sogar drei Proben einen noch höheren Gehalt von $> 6,3$; nur eine Probe von insgesamt 15 hatte einen niedrigeren Keimgehalt von weniger als $\log_{10}$ 3,3 ergeben.
Die Keimzahlen der Schrote variierten stärker als diejenigen der untersuchten Mischfuttermittel (Tabelle 8).

3.2.1.2. Keimgehalt der Futtermittel bei Zusatz von Streptomycin oder Chloramphenicol als Selektor

Wenn Streptomycin oder Chloramphenicol dem Nährboden

Tabelle 8

Ergebnisse der Keimzahlbestimmung von 52 Futtermittelproben bei Verwendung von Violet Red Bile Agar als Anzuchtmedium für Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae

Art und Anzahl der Proben	$\log_{10}$ der Keimzahlen pro Gramm Futtermittel	Verteilung der Einzelwerte auf folgende $\log_{10}$-Bereiche			
		< 3,3	3,3-4,5	4,6-6,3	>6,3
Gerste 15	< 3,3 - >6,3	1	1	10	3
Hafer 14	4,3 - >6,3	-	1	12	1
Weizen 12	3,4 - 6,3	-	5	7	-
Schrot 6	3,5 - >6,3	-	3	2	1
Mischfutter 5	4,2 - 5,0	-	2	3	-

zugegeben waren, dann entwickelten sich Keime nur bei 18 von 22 Proben, in Gegenwart von Streptomycin bzw. Chloramphenicol. Während bei Streptomycinzusatz die maximale Keimkonzentration bei $\log_{10}$ 3,8 lag, waren bei Chloramphenicolzusatz Keime bis zu $\log_{10}$ 4,6 zu finden. Grundsätzlich waren jedoch im Vergleich zur Gesamtkeimzahl die Werte Streptomycin- resp. Chloramphenicol- resistenter Keime weitaus geringer als diejenigen der Faecalflora landwirtschaftlicher Nutztiere (SIEBERT, 1982) (Tabelle 9 und 10).

3.2.1.3. Keimgehalt der Futtermittel bei Zusatz von As^{3+}-, Cu^{2+}- und Zn^{2+}-Ionen als Selektor

Aus Tabelle 11 geht hervor, daß sich die Keime größtenteils auch heute noch als sensibel gegenüber Schwermetallen und Metalloiden wie Arsen erweisen. Die Keime sprachen am wenigsten gegenüber Arsen an. Bei 28 von insgesamt 52 Proben waren überhaupt keine Bakterien mit Resistenz gegenüber Arsen, Kupfer oder Zink nachweisbar unter Berücksichtigung der Nachweisgrenze von $\log_{10} < 3{,}3$ bei dem verwendeten quantitativen Verfahren.
Es ergaben sich Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens Metallionen-resistenter Keime in Abhängigkeit, ob es sich dabei um das untersuchte Keimfutter (Ganzkorn) gehandelt hatte oder um Schrot oder Mischfutter (Tabelle 12). Ganzkorn hatte generell die höheren Keimzahlen an gramnegativen Stäbchenbakterien aufgewiesen, zugleich zeigten sich diese Keime auch verhältnismäßig häufiger resistent gegenüber As^{3+}, Cu^{2+} und Zn^{2+} (Tabelle 13).

Tabelle 9

Zahlenmäßiger Anteil Streptomycin-resistenter Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae an der Gesamtkeimzahl pro Gramm Futtermittel mit Violet Red Bile Agar erfaßter gramnegativer Stäbchenbakterien

Art der Futtermittel	Wachstum in Gegenwart von Streptomycin Anzahl der Proben		$\log_{10}$ der Keimzahlen/g Futtermittel Ø - Werte bzw. Bereiche		
	positiv	negativ	ohne Streptomycinzusatz	mit Streptomycinzusatz	Gesamtzahl untersuchter Proben
Gerste	5	10	<3,3 - >6,3	< 3,3	15
Hafer	8	6	4,3 - >6,3	<3,3 - 3,8	14
Weizen	1	11	3,4 - >6,3	<3,3	12
Schrot	2	4	3,5 - >6,3	<3,3	6
Mischfutter	2	3	4,2 - 5,0	< 3,3	5

Tabelle 10

Zahlenmäßiger Anteil Chloramphenicol-resistenter Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae an der Gesamtkeimzahl pro Gramm Futtermittel mit Violet Red Bile Agar erfaßter gramnegativer Stäbchenbakterien

Art der Futtermittel	Wachstum in Gegenwart von Chloramphenicol		$\log_{10}$ der Keimzahlen/g Futtermittel Ø - Werte bzw. Bereiche		
	Anzahl der Proben		ohne Chloramphenicolzusatz	mit Chloramphenicolzusatz	Gesamtzahl untersuchter Proben
	positiv	negativ			
Gerste	7	8	< 3,3 -> 6,3	< 3,3 - 3,4	15
Hafer	8	6	4,3 -> 6,3	< 3,3 - 4,6	14
Weizen	3	3	3,5 -> 6,3	< 3,3	12
Schrot	3	3	< 3,5 - 4,3	< 3,3 - 4,3	6
Mischfutter	1	4	< 3,3 - 4,2	< 3,3	5

Tabelle 11

Keimzahlen der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae auf Violet Red Bile Agar mit und ohne Zusatz von As^{3+}-, Cu^{2+}- und Zn^{2+}- Ionen als Selektor

Zusatz	Anzahl positiver Proben	Verteilung der Einzelwerte der Keimzahlen auf folgende $\log_{10}$- Bereiche, bezogen auf ein Gramm Futtermittel				
		$>6,3$	6,3 - 5,5	5,4 - 4,5	4,4 - 3,3	$<3,3$
OHNE	52	6	7	27	11	1
As^{3+}	52	5	2	17	21	7
Cu^{2+}	47	-	-	12	21	14
Zn^{2+}	29	-	-	9	13	6

Tabelle 12

Häufigkeitsverteilung der Keimzahlen von Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae auf Violet Red Bile Agar mit und ohne Zusatz von Metallionen bei Aufschlüsselung des Untersuchungsmaterials

Futtermittel	Zusatz Anzahl positiver Proben	Verteilung der Einzelwerte der Keimzahlen auf folgende $\log_{10}$-Bereiche, bezogen auf ein Gramm Futtermittel				
		>6,3	6,3 - 5,5	5,4 - 4,5	4,4 - 3,3	<3,3
	ohne					
Ganzkorn	41	5	7	22	6	1
Schrot	6	1	-	2	3	-
Mischfutter	5	-	-	3	2	-
	As^{3+}					
Ganzkorn	41	3	2	14	17	5
Schrot	6	2	-	1	1	2
Mischfutter	5	-	-	-	4	1
	Cu^{2+}					
Ganzkorn	38	-	-	12	14	12
Schrot	4	-	-	-	3	1
Mischfutter	5	-	-	-	4	1
	Zn^{2+}					
Ganzkorn	23	1	-	6	12	4
Schrot	3	-	-	2	2	-
Mischfutter	3	-	-	1	-	2

Häufigkeitsverteilung der Keimzahlen von Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae auf Violet Red Bile Agar mit und ohne Zusatz von Metallionen bei Berücksichtigung der Getreideart

Getreideart	Zusatz Anzahl positiver Proben	Verteilung der Einzelwerte der Keimzahlen auf folgende $\log_{10}$- Bereiche, bezogen auf ein Gramm Futtermittel				
		> 6,3	5,3 - 5,5	5,4 - 4,5	4,4 - 3,3	< 3,3
	ohne					
Gerste	15	3	3	7	1	1
Hafer	14	1	2	4	5	3
Weizen	12	-	1	7	4	-
	As^{3+}					
Gerste	15	1	2	4	5	3
Hafer	14	2	-	8	4	-
Weizen	12	-	-	2	8	2
	Cu^{2+}					
Gerste	14	-	-	5	4	5
Hafer	14	-	-	7	6	1
Weizen	10	-	-	-	4	6
	Zn^{2+}					
Gerste	7	-	-	3	3	1
Hafer	13	1	-	2	7	3
Weizen	3	-	-	1	2	-

3.2.2. Ergebnisse der qualitativen Erfassung von Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae

3.2.2.1. Resultat der Keimdifferenzierung

Unter der Voraussetzung, daß eine selektive Anzucht der Keime unter Zusatz von Metallionen zum flüssigen Anzuchtmedium vorgenommen worden war, gelangten in weit größerer Zahl Keime auf Violet Red Bile Agar zur Entwicklung, die rote oder violett-rote Kolonien bildeten.
Bei der Bestimmung der Artzugehörigkeit war auch die Artenvielfalt größer als bei direkter Anzucht auf festem Nährboden (Abbildung 1). Nach Vorkultur der Keime in Brilliant Green Broth erwiesen sie sich nicht nur als zu den Enterobacter agglomerans und Enterobacter cloacae gehörig, sondern auch zu Enterobacter sakazakii.
Während nach direkter Anzucht auf festem Nährboden neben Keimen der Gattung Klebsiella und Pseudomonadaceae nur sehr vereinzelt Vertreter von Escherichia coli, Serratia und Citrobacter isoliert wurden, ließen sich nach Vorkultur der Keime in Brilliant Green Broth etliche Vertreter der letztgenannten Spezies identifizieren (Abbildung 1 a und b).
Gegenüber diesen traten die Pseudomonadaceae stärker zurück. Allerdings war jeweils auch ein größerer Prozentsatz als nicht-klassifizierbare Enterobacteriaceae anzusprechen, was nicht überrascht, da die Keime der Umwelt oft nicht in das System medizinisch bedeutsamer Vertreter einzuordnen sind. Sie wiesen mitunter das eine oder andere Merkmal nicht auf, worauf die Differenzierung aufgebaut wurde.

Abbildung 1

Häufigkeit des Nachweises bestimmter Keimarten
in Abhängigkeit vom verwendeten Züchtungsverfahren

a) Zugehörigkeit der Isolate, die direkt auf Violet Red Bile Agar angezüchtet wurden

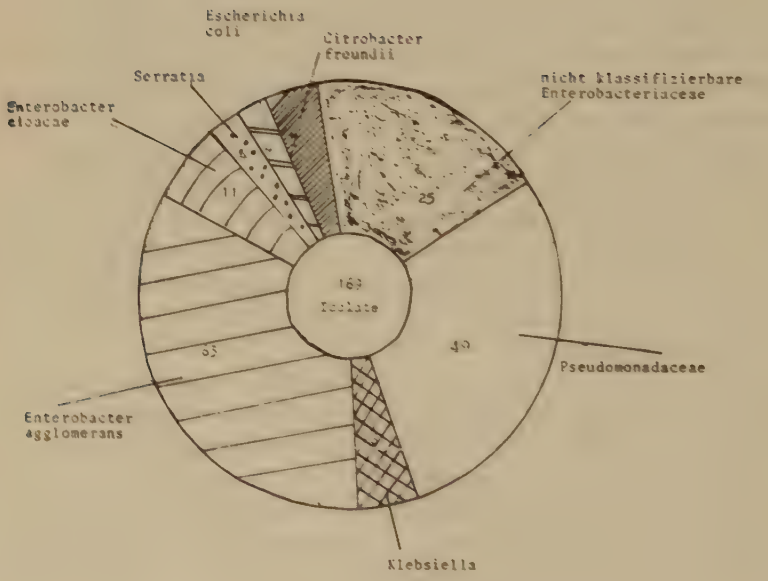
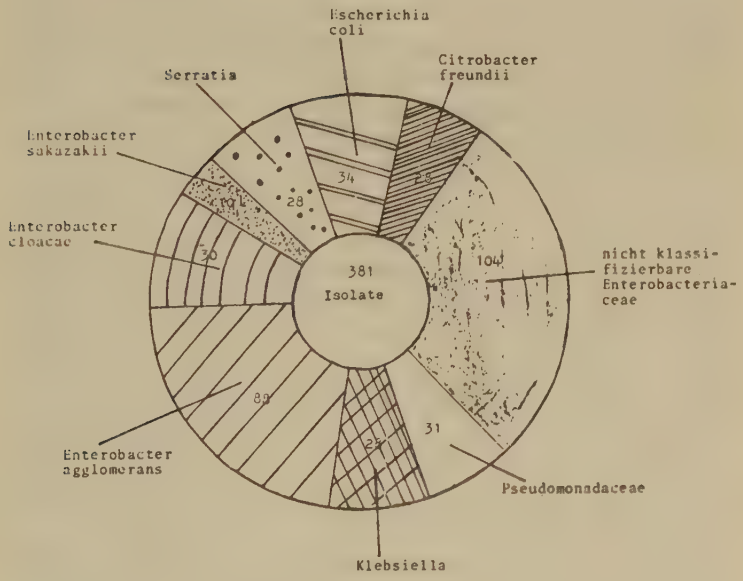


Abbildung 1 (Fortsetzung)

Häufigkeit des Nachweises bestimmter Keimarten in Abhängigkeit von verwendeten Züchtungsverfahren

b) Zugehörigkeit der Isolate, die nach Vorkultur in Brilliant Green Broth auf Violet Red Bile Agar gezüchtet wurden



3.2.2.2. Metallionen als Selektor von Pseudomonadaceae und verschiedenen Arten und Gattungen der Enterobacteriaceae

Grundsätzlich wurden häufiger Enterobacteriaceae auf Violet Red Bile Agar nachgewiesen, wenn eine Vorkultur in Brilliant Green Broth erfolgte. Auf diese Weise gelangten, wie bereits erwähnt, außer Enterobacter agglomerans, Enterobacter cloacae, Klebsiellen und einer relativ großen Zahl nicht klassifizierbarer Enterobacteriaceae auch noch Vertreter der Gattung Serratia, sowie Enterobacter sakazakii, Escherichia coli und Citrobacter freundii zur Entwicklung, während dessen die Pseudomonadaceae stärker zurücktraten (Tabelle 14). Da diese Keimarten dennoch gegenüber den anderen bei der direkten Kultivierung auf Violet Red Bile Agar festgestellten Spezies bei Verwendung gleicher Selektoren, As^{3+} bzw. Cu^{2+}, repräsentiert waren, spricht das dafür, daß diese Arten prinzipiell in geringeren Keimzahlen in Futtermitteln vorliegen als Enterobacter agglomerans, Enterobacter cloacae und Klebsiellen. Die Enterobacter-Arten dominierten auch, wenn der Brilliant Green Broth Hg^{2+} oder Pb^{3+} als Selektor zugesetzt worden war. Mit Co^{2+} als Selektor waren sie gegenüber Escherichia coli und Citrobacter freundii unterrepräsentiert, was möglicherweise darauf zurückzuführen ist, daß die Kobalt-Resistenz eine Eigenschaft ist, die weniger verbreitet ist, als beispielsweise die Resistenz gegenüber As^{3+}, Cu^{2+}, Zn^{2+} oder Pb^{3+}. Mit Hg^{2+}-Zusatz wurde zu einem hohen Prozentsatz Enterobacter agglomerans festgestellt. Andere Enterobacteriaceae waren nur vereinzelt oder gar nicht zum Nachweis

Tabelle 14

Metallionen als Selektoren von Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae

Systematische Zugehörigkeit der Isolate	Selektive Anzucht mit festem Medium				Selektive Anzucht mit flüssigem Medium					
	Anzahl der Isolate				Anzahl der Isolate					
	insgesamt	As^{3+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	insgesamt	As^{3+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{3+}
Klebsiella	6	3	-	3	28	7	5	10	-	6
Enterobacter agglomerans	63	36	16	11	88	26	11	16	15	20
Enterobacter cloacae	11	6	4	1	30	5	7	7	1	10
Enterobacter sakazakii	-	-	-	-	10	2	4	2	-	2
Serratia	4	-	2	2	28	6	7	7	-	8
Escherichia coli	4	1	1	2	34	1	14	7	-	12
Citrobacter freundii	7	2	5	-	28	8	9	6	1	4
nicht klassifizierbare Enterobacteriaceae	25	12	9	4	104	23	23	27	2	29
Enterobacteriaceae insgesamt	120	61	37	22	350	78	80	82	19	91
Pseudomonadaceae	49	18	17	14	31	-	7	15	5	4

gelangt, obwohl es sich um das gleiche Ausgangsmaterial gehandelt hatte. Bei der Selektion Metallionen-resistenter Keime mit Vorkultur in Brilliant Green Broth waren im Durchschnitt pro Ansatz zwei verschiedene Vertreter der Enterobacteriaceae resp. Pseudomonadaceae erfaßt worden.
Bei direkter Verimpfung des Untersuchungsmaterials hatte dagegen jeder fünfte Ansatz keine Enterobacteriaceae bzw. Pseudomonadaceae ergeben und auf die vier positiven Ansätze entfiel jeweils im Durchschnitt nur ein Isolat.
Grundsätzlich kann jedoch gesagt werden, daß mit Ausnahme der Resistenz gegenüber Hg^{2+} die Unempfindlichkeit gegenüber den anderen als Selektor verwendeten Metall- und Metalloid - Ionen eine relativ weit verbreitete Eigenschaft zu sein scheint und für Keime der KES-Gruppe ebenso zutrifft wie für Escherichia coli und Citrobacter freundii. Die Pseudomonadaceae wurden bei der Vorkultur in Brilliant Green Broth in Gegenwart von As^{3+} durch die Enterobacteriaceae im Medium anscheinend unterdrückt, denn im Gegensatz zur direkten Anzucht auf Violet Red Bile Agar (Tabelle 14) ließ sich hierbei kein Vertreter isolieren.
Die Resistenz gegenüber Cu^{2+} dürfte bei diesen Keimen möglicherweise jene Eigenschaft sein, die in Bezug auf Unempfindlichkeit gegenüber Metallionen am häufigsten vorkommt.

3.2.2.3. Ansprechbarkeit der Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae gegenüber Antibiotika und synthetischen Chemotherapeutika

Grundsätzlich erwiesen sich die Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae häufiger als resistent gegenüber den sieben wichtigsten Chemotherapeutika (Tabelle 15), wenn sie direkt auf Violet Red Bile Agar angezüchtet worden waren. Bei Vorkultur in Brilliant Green Broth waren sie größtenteils nur mäßig sensibel und teilweise weniger resistent (Abbildung 2 u. 3). Es zeichnete sich in der Empfindlichkeit gegenüber den einzelnen, getesteten Stoffen eine gewisse Abhängigkeit in Bezug auf das Antibiotikum und die systematische Zugehörigkeit der Keime ab. Allerdings erwiesen sich die Isolate prinzipiell als hauptsächlich resistent gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol, Sulfonamid und Furazolidon, wenn es sich um Pseudomonadaceae handelte.
Bei den Enterobacteriaceae fielen relativ hohe Prozentsätze an Resistenz gegenüber Ampicillin und Sulfonamid im Vergleich zu den Quoten gegenüber den anderen geprüften Stoffen auf.
Die Testung von ß-Lactam-Antibiotika (Carbenicillin und Cephalotin) zeigte für beide Familien relativ hohe Quoten an Resistenz. Anders verhielt es sich mit der Resistenz der Pseudomonadaceae gegenüber Aminoglykosiden. Mit Ausnahme der Resistenz der Pseudomonadaceae gegenüber Spektinomycin (32 %) waren die Isolate zu einem hohen Prozentsatz (= 90 %) sensibel oder zumindest mäßig sensibel gegenüber Streptomycin, Kanamycin, Amikacin und Gentamicin.

Abbildung 2

Ansprechbarkeit von Enterobacteriaceae aus Futtermitteln gegenüber Chemotherapeutika

a) nach selektiver Anzucht auf festen Nährböden (Violet Red Bile Agar mit Metallionenzusatz)

b) nach selektiver Anzucht in flüssigen Nährböden (Brilliant Green Broth mit Metallionenzusatz)

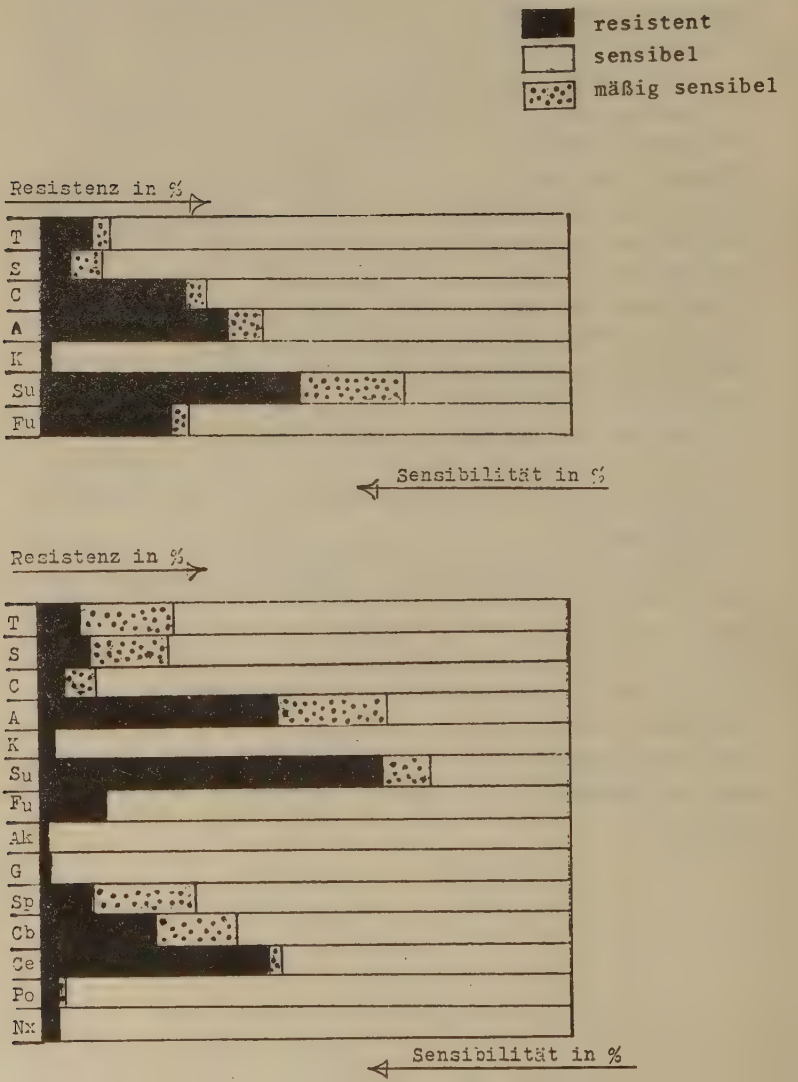
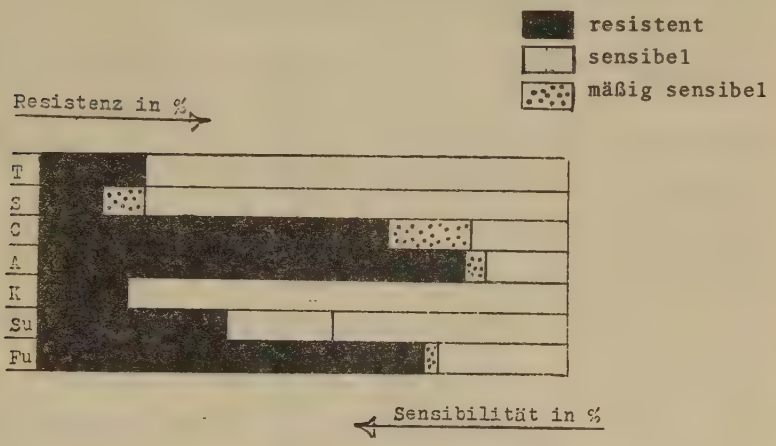


Abbildung 3

Ansprechbarkeit von Pseudomonas aus Futtermitteln gegenüber Chemotherapeutika

a) nach selektiver Anzucht auf festen Nährböden (Violet Bile Agar mit Metallionenzusatz

b) nach selektiver Anzucht in flüssigen Nährböden (Brilliant Green Broth mit Metallionenzusatz)



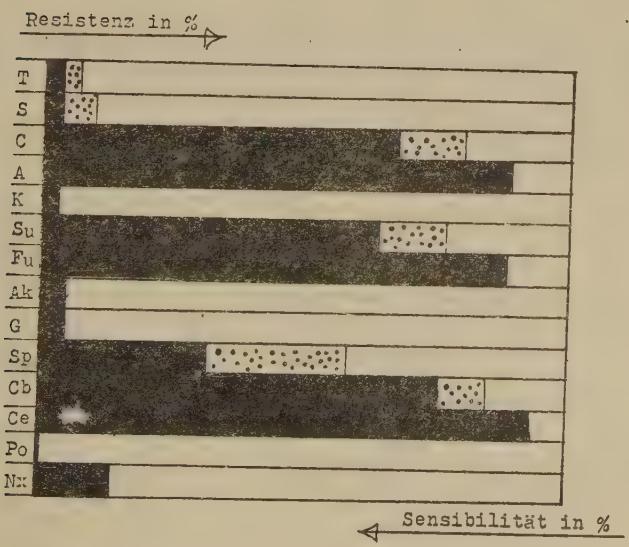


Tabelle 15

Allgemeine Resistenzquoten auf festem Nährmedium selektiv angezüchteter Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae und jeweilge Ansprechbarkeit der näher differenzierten Isolate gegenüber 7 Chemotherapeutika

Systematische Zugehörigkeit	Anzahl der geprüften Isolate	R/MS	Jeweilge Anzahl von resistenten (R) und mäßig sensiblen (MS) Isolaten T	S	C	A	K	Su	Fu
Klebsiella spp.	6	R	-	1	1	6	-	5	-
		MS	-	-	-	-	-	1	-
Enterobacter agglomerans	63	R	6	4	15	26	2	25	21
		MS	1	4	4	7	1	18	-
Enterobacter cloacae	11	R	1	-	3	5	-	9	1
		MS	1	-	-	2	-	1	1
Serratia	4	R	-	-	-	-	-	2	-
		MS	-	-	-	-	-	-	-
Citrobacter freundii	7	R	2	-	3	2	-	3	-
		MS	-	-	-	-	-	2	-
E. coli	4	R	-	-	-	-	-	3	-
		MS	-	-	-	-	-	1	-
nicht klassifizierbare Enterobacteriaceae	25	R	3	-	12	14	-	13	9
		MS	-	-	3	1	-	1	2
Enterobacteriaceae insgesamt	120	R in %	10	6	28	43	2	50	25
		MS %	3	6	5	10	1	20	3
Pseudomonadaceae	49	R in %	20	12	67	82	17	36	74
		MS %	-	8	18	4	-	20	2

Tabelle 16

Allgemeine Resistenzquoten mit flüssigem Nährboden selektiv vorkultivierter Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae und jeweilige Ansprechbarkeit der näher differenzierten Isolate gegenüber 14 Chemotherapeutika

Systematische Zugehörigkeit	Anzahl der geprüften Isolate	Jeweilige Anzahl resistenten (R) und mäßig resistenten (MS) Isolaten							
		R/MS	T	S	C	A	K	Su	Fu
Klebsiella pneumoniae/ ozaenae	28	R	2	3	1	19	-	24	3
		MS	3	6	1	4	-	1	-
Enterobacter agglomerans	88	R	3	2	10	41	-	36	41
		MS	5	4	2	18	-	11	-
Enterobacter cloacae	30	R	8	4	2	22	-	24	1
		MS	2	8	4	6	-	1	-
Enterobacter sakazakii	10	R	-	1	-	1	-	9	3
		MS	1	1	1	-	-	-	-
Serratia liquefaciens/ rubidea	28	R	2	3	-	12	-	24	1
		MS	13	5	7	6	-	1	-
Escherichia coli	34	R	1	6	-	3	-	26	4
		MS	13	12	1	10	-	3	-
Citrobacter freundii	28	R	-	1	1	19	5	20	4
		MS	8	4	2	3	-	3	-
nicht klassifizierbare Enterobacteriaceae	104	R	12	14	6	41	5	66	13
		MS	21	13	2	27	-	11	-
Enterobacteriaceae insgesamt	350	R in %	8	10	5	46	3	66	13
		MS in %	18	15	6	21	-	9	-
Pseudomonadaceae	31	R in %	3	3	68	90	3	65	13
		MS in %	3	6	13	-	-	13	-

Tabelle 16 (Fortsetzung)

Systematische Zugehörigkeit	Anzahl der geprüften Isolate	Jeweilige Anzahl von resistenten (R) und mäßig resistenten(MS) Isolaten							
		R/MS	Ak	G	Sp	Cb	Ce	Po	N[x]
Klebsiella pneumoniae/ ozaenae	19	R	-	-	-	6	1	-	2
		MS	-	-	6	5	-	1	-
Enterobacter agglomerans	82	R	-	1	3	16	50	2	2
		MS	-	-	9	18	3	-	-
Enterobacter cloacae	26	R	-	-	6	12	14	-	-
		MS	1	-	6	1	-	-	-
Enterobacter sakazakii	6	R	-	-	1	-	5	1	-
		MS	-	-	-	-	-	-	-
Serratia liquefaciens/ rubidea	26	R	-	-	4	2	19	1	-
		MS	-	-	6	3	-	-	-
Escherichia coli	28	R	-	1	5	3	5	-	-
		MS	-	-	10	2	-	-	-
Citrobacter freundii	22	R	-	-	3	10	13	2	1
		MS	2	-	6	2	-	-	-
nicht klassifizierbare Enterobacteriaceae	91	R	2	3	9	16	30	3	5
		MS	2	-	17	17	3	1	-
Enterobacteriaceae	300	R in %	1	2	10	22	44	3	3
		MS in %	1	-	20	16	2	1	-
Pseudomonadaceae	22	R in %	5	5	32	77	95	-	14
		MS in %	-	-	27	9	-	-	-

Ein gehäuftes Auftreten von Streptomycin- und Spektinomycinresistenz wurde bei Escherichia coli gefunden. Citrobacter freundii erwies sich stattdessen als einzige Art relativ häufig als Kanamycin-resistent und sprach auch häufig nicht auf Spektinomycin an. Die Klebsiellen waren stets Spektinomycin-empfindlich, sie erwiesen sich teilweise als Nalidixinsäure resistent. (Siehe Tabelle 16). Im Vergleich zu den Enterobacteriaceae der Darmflora von Tier und Mensch überraschen die relativ niedrigen Quoten an Resistenz gegenüber Carbenicillin und Cephalotin (SIEBERT, 1982). Da die prozentualen Resistenzquoten nicht so viel aussagen, wie die Häufigkeit, mit welcher eine Resistenz bei den verschiedenen Isolaten unterschiedlicher systematischer Zugehörigkeit festgestellt wurde ., wurden die Ergebnisse der Empfindlichkeitsprüfung unter Berücksichtigung der systematischen Zugehörigkeit der Isolate zu verschiedenen Arten bzw. Gattungen für die Enterobacteriaceae der Rangfolge nach aufgelistet (s. Tabelle 17).

Tabelle 17

Häufigkeit von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei Enterobacteriaceae

Systematische Zugehörigkeit der Isolate	Reihenfolge der Häufigkeit von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika											Antibiotika, gegenüber denen sämtliche Isolate empfindlich waren
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
Klebsiella pneumoniae/ ozaenae	Su	A	Cb	S	Fu	Nx	C	T	Ce			K Sp G Ak Po
Enterobacter agglomerans	Ce	A	Sp	Fu	Cb	C	Sp	T	S	Po	Nx	K Ak
Enterobacter cloacae	Su	A	Ce	Cb	T	Sp	C	S	Fu			K Ak G Nx Po
Enterobacter sakazakii	Su	Ce	Fu	Sp	Po	A	S					T C K Ak G Nx Cb
Serratia liquefaciens/ rubidea	Su	A	Sp	Ce	Cb	S	T	G	Fu			C K Ak Po Nx
Escherichia coli	Su	S	Sp	Ce	Cb	A	G	T				C K Ak Po Nx
Citrobacter freundii	Su	A	Ce	Cb	K	Sp	Fu	Po	Nx	C	S	T Ak G
Nicht-klassifizierbare Enterobacteriaceae	Su	A	Ce	Cb	S	T	Sp	C	Fu	K	Nx	

3.2.2.4. Gegenüberstellung von Anzuchtverfahren und Häufigkeit des Nachweises von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei den Isolaten

Bei Anzucht der Keime mit nur drei Metallionen, nämlich As^{3+}, Co^{2+} und Zn^{2+}, als Selektor und der Verwendung des festen Nährbodens Violet Red Bile Agar als Grundmedium waren die Isolate hauptsächlich häufiger resistent gegenüber Chloramphenicol und Furazolidon (Tabelle 18), wenn es sich um Enterobacteriaceae handelte.
Bei den Pseudomonadaceae erwiesen sich die Isolate stattdessen häufiger resistent gegenüber Tetracyclin, Streptomycin und Kanamycin, als wenn eine Vorkultur in Brilliant Green Broth erfolgt war und dabei fünf verschiedene Metallionen als Selektor, nämlich As^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+} und Pb^{3+} verwendet worden waren.
Für die Enterobacteriaceae und Pseudomanadaceae lagen dann die Resistenzquoten gegenüber Sulfonamiden höher; bei den Pseudomandadaceae traf das auch für Furazolidon zu.

Tabelle 18

Gegenüberstellung der Resistenzquoten gegenüber Chemotherapeutika mit zwei unterschiedlichen Verfahren selektiv angezüchteter Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae

Systematische Zugehörigkeit	Jeweiliger Prozentsatz resistenter Isolate													
	T		S		C		A		K		Su		Fu	
	I*	II**	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Enterobacteriaceae	10	8	6	10	28	5	43	46	2	3	50	66	27	13
Pseudomonadaceae	20	3	12	3	67	68	82	90	16	3	37	65	74	90

I* = Violet Red Bile Agar mit As^{3+}, Cu^{2+} bzw. Zn^{2+} als Selektor

II*= Brilliant Green Broth mit As^{3+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, bzw. Pb^{3+} als Selektor

Zeichenerklärung siehe Tabelle 7

Bei Berücksichtigung, welches Metallion als Selektor Verwendung fand, zeigte sich, daß bei Anzucht mit dem festen Medium die Enterobacteriaceae, unabhängig vom Selektor, resistent gegenüber Chloramphenicol, Ampicillin und Sulfonamiden waren, während die Pseudomonadaceae weniger empfindlich gegenüber Chloramphenicol und Ampicillin waren, aber daneben auch häufiger Furazolidonresistenz zeigten (Tabelle 19).

Tabelle 19

Häufigkeit von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei selektiver Anzucht von Enterobacteriaceae (E) und Pseudomonadaceae (PS) auf Violet Red Bile Agar

Chemotherapeutikum	Jeweilige Anzahl resistenter Isolate					
	Selektor					
	As^{3+}		Cu^{2+}		Zn^{2+}	
	E	PS	E	PS	E	PS
Tetracyclin	8	3	3	5	1	2
Streptomycin	3	2	3	2	1	2
Chloramphenicol	20	11	9	12	5	10
Ampicillin	20	14	17	14	14	12
Kanamycin	2	0	0	5	0	3
Sulfonamid	31	7	18	7	11	4
Furazolidon	20	12	8	12	4	12
Anzahl insgesamt geprüfter Isolate	61	18	37	17	22	14

Tabelle 20

Häufigkeit von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei selektiver Anzucht von Enterobacteriaceae (E) und Pseudomonadaceae (PS) mit Brilliant Green Broth (Ergebnis Testplatte 1)

Chemotherapeutikum	Jeweilige Anzahl resistenter Isolate									
	Selektor									
	As^{3+}		Co^{2+}		Cu^{2+}		Hg^{2+}		Pb^{3+}	
	E	PS	E	PS	E	PS	E	PS	E	PS
Tetracyclin	8	-	4	-	9	1	1	-	6	-
Streptomycin	5	-	11	-	10	1	1	-	7	-
Chloramphenicol	3	-	3	3	6	9	3	5	4	4
Ampicillin	36	-	36	6	43	15	8	4	37	3
Kanamycin	2	-	3	-	2	1	-	-	3	-
Sulfonamid	51	-	61	6	50	8	7	3	63	3
Furazolidon	6	-	12	5	14	14	2	5	11	4
Anzahl insgesamt geprüfter Isolate	77	0	80	7	80	15	20	5	93	4

Ein spezieller Selektionseffekt eines bestimmten Metallions bei Anzucht der Keime in flüssigem Medium zeichnete sich nicht ab. Vor allem erwiesen sich die Metallionen nicht als Selektor Tetracyclin- oder Streptomycin-resistenter Keime. Auffallend eine relativ hohe Quote an Ampicillin-Sulfonamid-resistenten Enterobacteriaceae bei Zusatz von Blei, Kupfer,

Kobalt und Arsen.
Die Anzahl mit Quecksilber selektierter Enterobacteriaceae war wesentlich geringer, als bei Anzucht mit den anderen Metallionen.
Auch diese Isolate erwiesen sich am häufigsten gegenüber diesen zwei Stoffen als resistent (Tabelle 20).
Mit Arsen im flüssigen Anzuchtmedium wurden überhaupt keine Pseudomonadaceae erfaßt. Bei zusätzlich getesteten weiteren sieben Chemotherapeutika war eine selektierende Wirkung der Metallionen nicht ablesbar.

Tabelle 20 (Fortsetzung)

Häufigkeit von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei selektiver Anzucht von Enterobacteriaceae (E) und Pseudomonadaceae (PS) mit Brilliant Green Broth (Ergebnis Testplatte 2)

Chemotherapeutikum	Jeweilige Anzahl resistenter Isolate									
	Selektor									
	As^{3+}		Co^{2+}		Cu^{2+}		Hg^{2+}		Pb^{3+}	
	E	PS	E	PS	E	PS	E	PS	E	PS
Amicacin	-	-	-	-	1	1	-	-	1	-
Gentamicin	-	-	-	-	3	1	-	-	2	-
Spektinomycin	3	-	7	2	11	3	-	1	10	1
Carbenicillin	13	-	15	2	15	10	3	4	21	1
Cephalotin	22	-	26	3	38	11	10	5	36	2
Polymyxin B	2	-	1	-	3	-	-	-	3	-
Nalidixinsäure	2	-	-	-	3	-	1	2	3	-
Anzahl insgesamt geprüfter Isolate	63	-	69	3	68	12	18	5	82	2

Bei Zusammenfassung der Ergebnisse, die bei der Mehrzahl gegenüber sieben Chemotherapeutika getesteter Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae erhalten worden waren, ergab sich für die Häufigkeit nachgewiesener Chemoresistenz unter Berücksichtigung des jeweiligen Metallions als Selektor teilweise eine übereinstimmende Reihenfolge (Tabelle 21).
Die ersten vier Plätze nehmen sowohl bei den Enterobacteriaceae als auch bei den Pseudomonadaceae jeweils die Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol und die synthetischen Chemotherapeutika Sulfonamid und Furazolidon ein.
Tetracyclin, Streptomycin und Kanamycin nehmen der Rangfolge nach in Bezug auf die bei den Keimen nachgewiesene Häufigkeit von Resistenz die Plätze fünf bis sieben ein (Tabelle 21).
Damit bestätigt sich abermals der bereits herausgestellte, grundlegende Unterschied zu denjenigen Lactose-positiven Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae (vgl. hierzu 3.2.2.3.), die im Darm von Mensch und Tier anzutreffen sind und zumindest beim landwirtschaftlichen Nutztier außer Sulfonamid-Resistenz in erster Linie Tetracyclin- und Streptomycin-Resistenz aufweisen (GEDEK, 1980, PAUL EHRLICH-GESELLSCHAFT, 1982, SIEBERT, 1982).

Tabelle 21

Reihenfolge der Häufigkeit von Resistenz gegenüber Chemotherapeutika bei Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae unter Berücksichtigung des jeweils als Selektor bei der Anzucht verwendeten Metallions

Reihenfolge	Enterobacteriaceae Metallionen als Selektor						Pseudomonadaceae Metallionen als Selektor					
	As^{3+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{3+}	Zn^{2+}	As^{3+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{3+}	Zn^{2+}
1	Su	Su	Su	A	Su	A	A	A	A	C	C	A
2	A	A	A	Su	A	Su	Fu	Su	Fu	Fu	Fu	C
3	Fu	Fu	Fu	C	Fu	C	C	Fu	C	A	A	Fu
4	C	S	C	Fu	S	Fu	Su	C	Su	Su	Su	Su
5	T	T	S	T	T	T	T		T			K
6	S	C	T	S	C	S	S		K			T
7	K	K	K		K				S			S

3.2.2.5. Häufigkeit von Einfach- und Mehrfachresistenz gegenüber Chemotherapeutika und sich daraus ergebende Resistenzmuster unter Berücksichtigung der verwendeten Metallionen als Selektor

Bei nicht allen Resistenzeigenschaften, die bei den aus Futtermitteln isolierten Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae gegenüber Antibiotika und synthetischen Chemotherapeutika nachgewiesen worden sind, ist das Merkmal auf Plasmide in der Bakterienzelle zurückzuführen.
Vielfach handelt es sich dabei um eine chromosomale Eigenschaft (WALTER und HEILMEYER, 1969; JACOBY und SWARTZ, 1980).Das trifft beispielsweise für die Nitrofurane (Furazolidon) oder die Polymyxine sowie die Nalidixinsäure zu (GEDEK, 1981 b).
Deshalb fanden sich bei der Zusammenstellung der Resistenzmuster (Tab. 22) nur jene Resistenzen, die heutzutage hauptsächlich bei gramnegativen Stäbchenbakterien plasmid-codiert sind (GEDEK, 1981 b) und die zugleich wiederholt nachgewiesen worden sind (SIEBERT, 1982).
Unter Berücksichtigung der sechs wichtigsten Resistenzdeterminanten, die bislang die weiteste Verbreitung gefunden haben (JACOBY und SWARTZ, 1980), wurden die in Tabelle 22 aufgeführten Kombinationen in den Merkmalen nachgewiesen.Eine sechs-fach-Resistenz, betreffend TSCAKSu wurde danach nur bei Keimen der Familie Pseudomonadaceae festgestellt.Dieses Resistenzbild dominiert ansonsten bei Escherichia coli aus der Faecalflora, wenn an landwirtschaftliche Nutztiere, besonders das Kalb, Fütterungsarzneimittel verabreicht worden waren (SIEBERT, 1982).
Desgleichen wurden auch andere Resistenzbilder, wie

Tabelle 22

Häufigkeit bestimmter Merkmalskombinationen der Chemoresistenz der mit Metallionen als Selektor aus Futtermitteln isolierten Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae, betreffend sechs weit verbreitete Plasmid-codierte Resistenzdeterminanten

ystematische ugehörigkeit	Violet Red Bile Agar				Brilliant Green Broth					
	Resistenzbild	Selektor Anzahl			Resistenzbild	Selektor Anzahl				
	TSCAKSu	As^{3+} n	Cu^{2+} n	Zn^{2+} n	TSCAKSu	As^{3+} n	Co^{2+} n	Cu^{2+} n	Hg^{2+} n	Pb^{3+} n
lebsiella neumoniae	CA Su			1	TSCA Su					1
	A Su	2		2	T A Su			1		
	A	1			A Su	6	3	2		4
					A			1		
					Su	1	1	1		
					sensibel			1		
lebsiella zeanae					S Su			1		
					S			1		
					A Su			2		
					Su			2		
nterobacter gglomerans	TSC	1			T A Su			1		
	T C Su	1			S A			1		
	T AK	1			CA Su	1			2	1
	TS	1			CA	1	1	2		
	T A		1		C Su			1		
	T K	1			C			1		
	T Su	1			A Su	5	2	3	1	5
	SC Su	1			A	2	2	2	3	5
	S		1		Su	6	1	1	2	2
	CA Su	1	2		sensibel	11	5	2	8	8
	CA	4	2							
	C Su	1								
	A Su	2								
	A	4	2	6						
	Su	9	3	3						
	sensibel	9	5	1						
terobacter oacae	T Su			1	TSCA Su				1	
	CA Su		1		TS A Su			1		
	CA		1		T A Su	1		1		1
	A Su	2	1		T Su					1
	Su	2	2		T			1		
	sensibel	1			S A			1		
					CA Su		1	1		
					A Su	3	4	1		5
					A		2			1
					Su	1				1
					sensibel			1		1

Tabelle 22

Häufigkeit bestimmter Merkmalskombinationen der Chemoresistenz der mit Metallionen als Selektor aus Futtermitteln isolierten Enterobacteriace und Pseudomonadaceae, betreffend sechs weit verbreitete Plasmid-codier Resistenzdeterminanten

Systematische Zugehörigkeit	Violet Red Bile Agar				Brilliant Green Broth					
	Resistenz-bild	Selektor Anzahl			Resistenz-bild	Selektor Anzahl				
	TSCAKSu	As^{3+} n	Cu^{2+} n	Zn^{2+} n	TSCAKSu	As^{3+} n	Co^{2+} n	Cu^{2+} n	Hg^{2+} n	P n
Enterobacter sakazakii					S Su		1			
					A Su			1		
					Su	2	3	1		2
Serratia	Su	1		2	TS A Su			2		
					S A Su	1				
	sensibel		1		A Su	2	2	3		2
					Su	1	5	2		4
					sensibel	2				2
Citrobacter freundii	T A		1		AKSu	1				
	T Su		1		SC		1			
	C	1	1		S Su		1			
	A		1		A Su	5	3	3	1	1
	Su	1	1		A		2	1		1
					KSu		3			
					K	1				
					Su	1		1		
					sensibel			1		1
Escherichia coli	Su	1		2	T Su		1			
			1		S Su		1			2
	sensibel		1		S		1			
					A Su					1
					A		1			
					Su	1	7	5		8
					sensibel		2	2		2

Tabelle 22

Häufigkeit bestimmter Merkmalskombinationen der Chemoresistenz der mit Metallionen als Selektor aus Futtermitteln isolierten Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae, betreffend sechs weit verbreitete Plasmid-codierte Resistenzdeterminanten

Systematische Zugehörigkeit	Violet Red Bile Agar				Brilliant Green Broth					
	Resistenzbild	Selektor Anzahl			Resistenzbild	Selektor Anzahl				
	TSCAKSu	As^{3+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}	TSCAKSu	As^{3+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{3+}
		n	n	n		n	n	n	n	n
nicht klassifizierbare Enterobacteriaceae	T C Su	1			TSCA Su		1			
	T C	1			TS A Su	1	1			
	T Su	1			T CA Su					1
	CA Su	1	2	1	T A Su	2	1			1
	CA		1	3	TS	2		1		
	C Su	2			S AKSu					1
	A Su		3		SCA		1			
	A	3			S KSu					1
	Su	1	1		S Su		2	1		2
	sensibel	2	2		A Su	4	8	10		6
					A	2		5		1
					KSu					1
					K		1	1		
					Su	6	7	3		7
					sensibel	5	2	5	2	9
Pseudomonadaceae	TSCAKSu		3	1	TSCAKSu			1		
	TSCA Su	2			CA Su		3	4	2	3
	T CAKSu		1	1	CA			3	2	
	T CAK		1		C Su				1	
	SCAKSu			1	A Su		2	3		
	CA Su	5	1		A		1	3		
	CA	2	6	6	Su		1			
	C	1			C			1		1
	A	4	2	3						
	Su		2	1						
	sensibel	3	1	1						

Tabelle 23

Häufigkeit bestimmter Merkmalskombinationen der Chemoresistenz der mi
Metallionen als Selektor aus Futtermitteln isolierten Enterobacteria-
ceae und Pseudomonadaceae, betreffend sechs weit verbreitete
Plasmid-codierte Resistenzdeterminanten

Systematische Zugehörigkeit	resistent	Selektor und jeweilige Anzahl der Isolate						Anzahl der Isolate insgesamt
		As^{3+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{3+}	Zn^{2+}	
Klebsiella spp.	6-fach							
	5-fach					1		1
	4-fach							
	3-fach				1		1	2
	2-fach	8	3	3		5	2	21
	1-fach	2	1	5				8
	sensibel		1	1				2
Entero-bacter agglomerans	6-fach							
	5-fach							
	4-fach							
	3-fach	5		3	2	1		11
	2-fach	17	3	10	1	5		36
	1-fach	21	3	10	5	6	10	55
	sensibel	20	5	7	8	8	1	49
Entero-bacter cloacae	6-fach							
	5-fach				1			1
	4-fach			1				1
	3-fach	1	1	2		1		5
	2-fach	6	4	4		7	1	22
	1-fach	3	2	3		1		9
	sensibel	1		1		1		3
Entero-bacter sakazakii	6-fach							
	5-fach							
	4-fach							
	3-fach							
	2-fach		1	1				2
	1-fach	2	3	1		2		8
	sensibel							
Serratia spp.	6-fach							
	5-fach							
	4-fach			2				2
	3-fach	1						1
	2-fach	2	2	3		3		9
	1-fach	1	5	3		4	1	14
	sensibel	2		1		2	1	6

Tabelle 23 (Fortsetzung)

Häufigkeit bestimmter Merkmalskombinationen der Chemoresistenz der mit Metallionen als Selektor aus Futtermitteln isolierten Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae, betreffend sechs weit verbreitete Plasmid-codierte Resistenzdeterminanten

Systematische Zugehörigkeit	resistent	Selektor und jeweilige Anzahl der Isolate						Anzahl der Isolate insgesamt
		As^{3+}	Co^{2+}	Cu^{2+}	Hg^{2+}	Pb^{3+}	Zn^{2+}	
E. coli	6-fach							
	5-fach							
	4-fach							
	3-fach		1					1
	2-fach		3			3		6
	1-fach	1	8	5		8	2	24
	sensibel		2	3		2		7
Citrobacter freundii	6-fach							
	5-fach							
	4-fach							
	3-fach	1						1
	2-fach	5	7	5	1	2		20
	1-fach	4	2	5		1		12
	sensibel			1		1		2
nicht klassifizierbare Enterobacteriaceae	6-fach			1				1
	5-fach		1					1
	4-fach	1	1			2		4
	3-fach	3	2	2		2	1	10
	2-fach	10	10	16		9	3	48
	1-fach	13	8	11		7		39
	sensibel	6	2	7	2	9		26
Pseudomonadaceae	6-fach	1		4			1	6
	5-fach	1		1			2	4
	4-fach			1				1
	3-fach	6	3	5	2	3		19
	2-fach	2	2	12	3	1	6	25
	1-fach	5	3	7			5	21
	sensibel	3		1				4

sie für coliforme Keime des Verdauungstraktes üblicherweise als charakteristisch anzusehen sind, nicht, oder nur mit geringer Häufigkeit nachgewiesen. Am häufigsten wurde ASu, A oder Su festgestellt; von den übrigen Resistenzbildern sind nur die Kombinationen TS, TSu, TA und TSCASu von den Enterobacteriaceae der Faecalflora von landwirtschaftlichen Nutztieren bekannt (SIEBERT, 1982).
Die Pseudomonadaceae waren allgemein höher mehrfachresistent, als die Enterobacteriaceae (Tab. 23). Prozentual am häufigsten wurde bei den Pseudomonadaceae eine ein-bis dreifach-Resistenz gegenüber den in die Betrachtung einbezogenen Chemotherapeutika festgestellt.
Unter den Enterobacteriaceae befanden sich auch etliche, die überhaupt empfindlich gegenüber den sechs Stoffen waren.Dies traf insbesondere für die relativ häufig isolierte Spezies Enterobacter agglomerans zu.
Diese Art, sowie die anderen Arten der Familie der Enterobacteriaceae erwiesen sich hauptsächlich als einfach oder zweifach resistent gegenüber den Chemotherapeutika (Tab. 22 und 23), nicht zuletzt, weil die Keime nicht sehr häufig resistent gegenüber Tetracyclin und Streptomycin waren.Infolgedessen bestand wenig Übereinstimmung in den Merkmalskombinationen mit Keimen gleicher systematischer Zugehörigkeit, aber einem Vorkommen an anderen Standorten.

4. DISKUSSION

Da in etwa 2/3 der Proben gramnegative Stäbchenbakterien in Keimzahlen von $\log_{10}$ 4,6 - 6,3 pro g Futtermittel nachzuweisen waren, bestätigte sich damit, daß diese als Epiphyten auf Pflanzen vorkommenden Keime einen nicht unerheblichen Anteil an dem Gesamtbesatz der Futtermittel stellen, denn Keimzahlen von $\log_{10}$ 6,0 kennzeichnen mitunter schon den Verderb (GEDEK, 1974).Bei Berücksichtigung, wie zahlreich darunter Streptomycin- oder Chloramphenicol-resistente Enterobacteriaceae oder Pseudomonadaceae vertreten waren, ist der Gehalt im Vergleich zum Vorkommen solcher Keime in den Faeces von landwirtschaftlichen Nutztieren mit max. $\log_{10}$ 3,8 bis $\log_{10}$ 4,6 als gering zu bezeichnen (SIEBERT, 1982). Weitaus höhere Konzentrationen der gramnegativen Stäbchenbakterien lagen vor, wenn Metallionen dem Anzuchtmedium zugesetzt waren.Der Anteil gegenüber As^{3+} unempfindlicher Keime lag mit $\log_{10}$ 5,4 /g fast so hoch wie die Gesamtkeimzahl von Escherichia coli in einem Gramm Kot von Schweinen (SIEBERT, 1982). Während es SIEBERT (1982) nicht gelang, aus dem Kot von Kalb und Schwein Co^{2+}- und Hg^{2+}-resistente Enterobacteriaceae zu züchten, waren sie bei den eigenen Untersuchungen nicht selten.Allerdings wurde bei den eigenen Untersuchungen eine größere Zahl unterschiedlicher Arten der Familie Enterobacteriaceae berücksichtigt und darüber hinaus auch den Pseudomonadaceae Beachtung geschenkt.Dabei fiel auf, daß die Keime am häufigsten unempfindlich gegenüber Cu^{2+} waren.

Hierin kann ein Zusammenhang mit der vielseitigen Verwendung von Kupferverbindungen als Pflanzenbehandlungsmittel gesehen werden.
Auch für die teilweise geringe Ansprechbarkeit gegenüber As^{3+}, Zn^{2+}, Pb^{3+} und Hg^{2+} läßt sich eine entsprechende Erklärung finden. Dagegen überrascht, daß sich sowohl die Pseudomonadaceae als auch die Enterobacteriaceae zu einem relativ hohen Prozentsatz gegenüber synthetischen Chemotherapeutika, Sulfonamiden und Furazolidon, als resistent erwiesen haben und hauptsächlich auf Ampicillin und Chloramphenicol nicht ansprachen. Antibiotika gegenüber, die verschiedentlich als Pflanzenbehandlungsmittel, wenn auch nicht hierzulande, zum Einsatz gelangten, wie Streptomycin, Tetracyclin und Kanamycin, waren sie auffallend häufig sensibel.
Auf Aminoglykoside sprachen sie allgemein sehr gut an, demzufolge gab dies keinen Hinweis für eine Ausbreitung der Gentamicin-Resistenz, die sich auf einem Transposon befinden soll (NUGENT et al., 1979) und sich ferner bei Klebsiellen im Klinikbereich ausgebreitet haben soll (O`BRIAN et al., 1980). Gentamicin-Resistenz wurde auch bei Salmonellen nachgewiesen (JACOBY und SWARTZ, 1980).
Ein Vergleich mit den prozentualen Angaben, die über das Vorkommen von Resistenz gegenüber Antibiotika bei der KES-Gruppe der Enterobacteriaceae, Escherichia coli, Citrobacter freundii und Pseudomonadaceae aus Untersuchungsmaterial des Menschen von der PAUL-EHRLICH-GESELLSCHAFT (1982) vorliegen, besteht eine deutliche Diskrepanz vor allem im Nachweis der Resistenz gegenüber Aminoglykosiden, Chloramphenicol

und Tetracyclin, während hinsichtlich der ß-Lactam-Antibiotika etwa Übereinstimmung besteht. Letzteres ergibt sich aus dem Wirkungsspektrum der einzelnen Stoffe (WALTER und HEILMEYER, 1969) und ist nicht zurückzuführen auf einen sekundären Erwerb von Resistenzeigenschaften.

5. ZUSAMMENFASSUNG

519 Isolate aus Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae aus 91 Futtermitteln (etwa zu zwei Drittel Körnerfutter und Getreideschrot und zu einem Drittel Mischfutter), wurden auf ihre Resistenzeigenschaften gegenüber Antibiotika und synthetischen Chemotherapeutika untersucht.

Die Keime wurden dazu mit Zusatz von Salzen verschiedener Metallionen (As^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Pb^{3+}, Zn^{2+}) unter Verwendung von Violet Red Bile Agar (OXOID, NR. CM 107) und Brilliant Green Broth (OXOID, Nr. CM 31) als flüssiges Medium zur vorherigen Anreicherung, selektiv angezüchtet, isoliert und getestet.

Bei über der Hälfte der Proben (n = 52) wurden auf Violet Red Bile Agar nicht nur einzelne Kolonien rot-violett wachsender Keime für die Antibiotika-Sensibilitätsprüfung angezüchtet, sondern zugleich der Gesamtkeimgehalt mit und ohne Zusatz von Metallionen an gramnegativen Stäbchenbakterien ermittelt und außerdem auch die zahlenmäßigen Anteile gegenüber den Antibiotika Streptomycin- und Chloramphenicol-resistenter Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae bestimmt.

Die Zuordnung der Isolate zu den Pseudomonadaceae einerseits und zu den Enterobacteriaceae andererseits erfolgte mit Hilfe des Cytochrom-Oxidase-Tests.

Für die weitere Keimdifferenzierung der Enterobacteriaceae wurde Enterotube II^R, Roche, verwendet.

Die Herstellung von Verdünnungen des Ausgangsmaterials für die Keimzählung und die Isolierung erfolgte nach GÖTZ (1978).Für die Testung des Verhaltens der Keime gegenüber den Chemotherapeutika wurde das Plattendiffusionsverfahren herangezogen.Die Auswertung erfolgte auf der Grundlage der Hemmhofdurchmesser unter Zugrundelegung der von den Normausschüssen DIN und NCCLS hierfür vorliegenden Richtwerten,

für "resistent", "mäßig sensibel" und "sensibel". Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae wurden in höheren Keimzahlen in den Futtermitteln festgestellt, wenn die Anzucht anstelle mit Streptomycin oder Chloramphenicol mit As^{3+}, Cu^{2+} bzw. Zn^{2+} erfolgt war.

Außer Arten der Klebsiella-Enterobacter-Serratia-Gruppe wurden auch Escherichia coli und Citrobacter freundii erfaßt. Ein nicht unbeträchtlicher Anteil konnte innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae nicht klassifiziert werden.

Bei Vorkultur der Keime in Brilliant Green Broth waren die Isolate weniger hoch mehrfach-antibiotikaresistent. Mit Hg^{2+} wurde die geringste Zahl an gramnegativen Stäbchenbakterien erfaßt; in Gegenwart von As^{3+} waren Enterobacteriaceae gegenüber Pseudomonadaceae selektiv im Vorteil. Bei den Enterobacteriaceae sowie den Pseudomonadaceae wurde eine Resistenz vor allem gegen Ampicillin, Chloramphenicol, Sulfonamiden und Furazolidon nachgewiesen. Durch geringere Quoten an Resistenz gegenüber Tetracyclin und Streptomycin unterschieden sich die Isolate von Vertretern gleicher Artzugehörigkeit tierischer Herkunft und erwiesen sich im Gegensatz zu den Stämmen menschlicher Herkunft gegenüber Aminoglykosiden, Kanamycin und Gentamicin vornehmlich sensibel oder zumindest mäßig sensibel.

Aufgrund von Unterschieden in den Resistenzeigenschaften von Mensch, Tier und Pflanze stammender Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae ist anzunehmen, daß zwischen Keimen der verschiedenen Biotope kein reger Genaustausch betreffend Merkmale der Chemoresistenz stattfindet. Selektionseffekte, die auf die Verwendung eines bestimmten Metallions zurückgeführt werden könnten, zeichneten sich in der Nachweishäufigkeit gegenüber einem oder mehreren Antibiotika nicht ab.

To the occurrence of chemo-resistant Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae in feedstuffs

SUMMARY

519 isolates from Enterobacteriaceae und Pseudomonadaceae out of a total amount of 92 feed-stuffs (two thirds grain and corn meal, one third mixed fodder) were tested as to their resistance to antibiotics and synthetic chemotherapeutics.
For this purpose, the germs were selectively cultivated, with the addition of different metalions (As^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Pb^{3+}, Zn^{2+}), isolated, with using violet red bile agar (OXOID, Nr. CM 107) and brilliant green broth (OXOID, Nr. CM 31) as a concentrating, fluid medium, and tested.
In more than half of the samples (n = 52), not only single colonies of red-violet growing germs has been cultivated on violet red bile agar, but also the total amount of germs with and without the addition of metalions, has been determined.
Apart from that, it ascertained the numerial proportions against the antibiotics streptomycin and chloramphenicol resistant Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae.
The association of the isolates to Pseudomonadaceae on the one hand, and Enterobacteriaceae on the other, was undertaken with the aid of the cytochrom-oxidase tests. Enterotube II^R (Roche) was used for a further differentiation of Enterobacteriaceae.The production of attenuations from the substance to be tested as regards the germ numeration and isolation was made according to GÖTZ (1978).Agar disc diffusion testing was used

for determining the germ`s behaviour to chemotherapeutics. The examination of isolates was made taking into consideration their inhibition zones according to the present guidelines for "resistant", "moderately susceptible" and "susceptible" of the standardisation commitees DIN and NCCLS.

Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae were found in higher counts in feeding stuffs, when cultivation was proceeded with As^{3+}, Cu^{2+} and Zn^{2+} instead of streptomycin or chloramphenicol.

Besides species of the Klebsiella-Enterobacter-Serratia group also Escherichia coli and Citrobacter freundii were comprised.

A considerable amount of gramnegative rod-shaped bacteria was comprised; using As^{3+}, Enterobacteriaceae were in a selektive advantage compared to Pseudomonadaceae.

Enterobacteriaceae as well as Pseudomonadaceae showed resistance especially to ampicillin, chloramphenicol, sulfonamide and furazolidon.

Isolates of the same species and of animal origin showed lower quotes of resistance to tetracyclin and streptomycin, thus differing from strains of human origin and proving themselves to be primarily susceptible, or at least moderately susceptible to ampicillin, kanamycin and gentamicin.

Due to variation in resistance traits of Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae of human. animal and plant origin, it can be concluded, that there is no frequent

gene transfer concerning traits of chemoresistance
of germs from differnet biotypes.
Selective effects, probably deriving from the
usage of a certain metalion, could not be demonstrated
according to the frequency of occurrence.

6. LITERATURVERZEICHNIS*

ARUNKUMAR, M., 1976:
The use of antibiotics for the control of plant virus diseases.
Z Pfl Kr, 84, 244 - 252.

BEWLEY, R. J. F., 1978:
The effects of zinc, lead and cadmium pollution on the leaf surface microflora of "Lolium perenne" L.
J gen Microbiol, 110, 247 - 254.

BEWLEY, R. J. F., 1980:
Effects of heavy metal on oak leaf microorganisms.
Appl environ Microbiol, 40, 1053 - 1059.

BEWLEY, R. J. F., CAMPBELL, R., 1980:
Influence of zinc, lead and cadmium pollutants on the microflora of hawthorn leafes.
Microb Ecol, 6, 227 - 240.

BROWN, A. G., BOYLE, A. M., 1944:
Penicillin treatment of crown gall.
Science, 100, 528.

BURKITT, A., LESTER, P., NICKLESS, G., 1972:
Distribution of heavy metals in the vicinity of an industrial complex.
Nature, 238, 327 - 328.

*nach LEISTNER, O., 1981
Internationale Titelabkürzungen,
3. Auflage

CHUKWUNYEAKA, I., 1980:
Einfluß der Substratfeuchtigkeit und antibakterieller Antibiotika auf das Vorkommen und auf die Sporenbildung von Drechslera oryzae bei routinemäßigen Saatgutuntersuchungen.
Z Pfl Kr, 87, 600 - 606.

COLE, J. S., 1960:
Field spray trials against wildfire and angular leaf spot of tobacco in Rhodesia.
Ann appl Biol, 48, 291 - 298.

COPLIN, D. L., 1978:
Properties of F and P group plasmids in Erwinia stewartii.
Phytopathology, 68, 1637 - 1643.

COWAN, S. T., 1974:
Family Enterobacteriaceae.
In: BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N.E.,
Bergey's manual of determinative bacteriology.
Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1974,
8. Aufl., 230.

DEKKER, J., 1963:
Antibiotics in the control of plant diseases.
Ann Rev Microbiol, 17, 243 - 261.

DIERCKE, 1980:
Weltstatistik 80/81,
Staaten, Wirtschaft, Bevölkerung, Politik.
Deutscher Taschenbuch Verlag, München, S. 236.

DOUDOROFF, M., PALLERONI, N. J., DYE, D. W., LELLIOT, R. A.:
Family Pseudomonadaceae.
In: BUCHANAN, R. E., GIBBONS, N. E.,
Bergey's manual of determinative bacteriology,
Williams and Wilkins Comp., Baltimore, 1974,
8. Aufl., 217.

DUTTA, B. K., ISAAC, I., 1981:
Control of Verticillium wilt of tomato by
antbiotic chemotherapy.
Z Pfl Kr, 88, 276 - 286.

DYE, M. H., 1958:
Development of streptomycin-resistant variants
of Pseudomonas syringae van Hall in culture
and in peach seedlings.
N Z Agric Res, 1, 44 - 50.

GEDEK, B., 1974:
Der mikrobiologische Zustand von Futtermitteln
aus der Sicht der Veterinärhygiene.
In: Unerwünschte Stoffe in Futtermitteln und
mögliche Rückstände in Lebensmitteln.
Hrsg. Fachverband der Futtermittelindustrie e.V.
Hamburg.

GEDEK, B., 1980:
Moderni promotori di crescita e resistenza batterica-
Modern growth promoters and bacterial resistance.
Estratto dal Volume "Performance nelle produzioni
animali", Tavola Rotando di Milano (11. ottobre 1979),
Edizioni Menerva Medica, pp 103 (ital.) ans 277 (engl.).

GEDEK, B., 1981 a:
Zur Wirkung von Kupfer in Tierfutter als Selektor antibiotika-resistenter E. coli-Keime beim Schwein.
Tierärztl Umschau, 36, 6 - 21.

GEDEK, B., 1981 b:
Occurrence of plasmid-determined resistance in bacterial populations of animal origin and from feeding-stuffs. In P. POHL und J. LEUNEN C.E.C. Seminar on Resistance and pathogenic plasmids. Publ. National Institut for Veterinary Research, Brüssel (Selbstverlag).

GINGELL, S. M., CAMPBELL, R., MARTIN, M. H., 1976:
The effect of zinc, lead and cadmium pollution on the leaf surface microflora.
Envir Pollut, 11, 25 - 37.

GÖTZ, A. 1978:
Zum Vorkommen und zur Differenzierung von Gelbpigmentierten Bakterien in Cerealien.
Diss. Vet. Med., Ludwig-Maximilians -Universität München

GOLDWATER, L. J., 1971:
Mercury in the environment.
Sci Am, 224, 16 - 21.

GOODMAN, R. N., 1962:
The impact of antibiotics upon plant disease control.
Adv pest contr res, 5, 1 - 46.

GOODMAN, R. N., 1980:
Possible human health effects of subtherapeutic antimicrobial use as pesticides.
In: Nat Acad Sc, The effects on human health of subtherapeutic use of antimicrobials in animal feeds. Appendix B, 1 - 18, Washington D. C..

GREEN, S. K., NIENHAUS, F., 1981:
Weitere Untersuchungen über die "latente Rosettenkrankheit" der Zuckerrübe.
Z Pfl Kr, 87, 142 - 147.

GRIFFITHS, D. J., PEVEGRINE, W. T. H., 1960:
Control of halo blight in oats.
Plant Path, 9, 10 - 14.

HEDGES, R. W., RODRIGUES, V., DATTA, N., 1975:
R Factors from Serratia marcescens.
J gen Microbiol, 86, 88 - 92.

HOFFMANN, G. M., NIENHAUS, F., SCHÖNBECK, H. C., WELTZIEN, H. C., WILBERT, H., 1976:
Lehrbuch der Phytomedizin,
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg.

HUISINGH, D., 1974:
Heavy metals: implications for agriculture.
Ann Rev Phytopath, 12, 375 - 388.

JACOBY, G. A., SWARTZ, M. N., 1980:
Plasmids: microbiologic and clinical importance.
In: WEINSTEIN L., FIELDS B.N., Seminars in infectious diseases, 3, Thieme Verlag, Stuttgart - New York, 1 - 37.

JANSEN, M., 1974:
Vorkommen, Nachweis und Bedeutung von Futtermittelkontaminationen durch Bakterien (mit Ausnahme der Salmonellen).
Diss. Vet. Med. Tierärztliche Hochschule Hannover

KARTHASHOVA, E., GORJACHEV, S.
Effect of zinc upon viability and virulence of the fungus Fusarium oxysporum f. sp. vasinfection.
In: LYR, H., POLTER, C.,
Systematische Fungizide und antifungale Verbindungen.
VI. Intern. Symp. der Gesellschaft für allg. und techn. Mikrobiol. in der Biol. Gesellschaft der DDR u. der Gesellschaft für Med. Mykol. der DDR. S. 373

KLEMMER, H. W., RIKER, A. J., ALLEN, C. N., 1955:
Inhibition of crown gall by selected antibiotics.
Phytopathology, 23, 618 - 625.

KNÖSEL, D., CORNILLS, H., 1980:
Untersuchungen über die Entwicklung des Erregers der Feuerbrand-Krankheit, Erwinia amylovora, im pflanzlichen Gewebe unter Einwirkung verschiedener Antibiotika.
Z Pfl Kr, 87, 493 - 500.

KNÖSEL, D., THILL, H., 1966:
Zum Auftreten der Steinobstbakteriose in Südwestdeutschland im Jahre 1965 und zu einleitenden Bekämpfungsversuchen.
Z Pfl Kr, 73, 266 - 269.

KRUGER, W., 1960:
Antibiotics as seed protectants.
S Afr J Agric Sci, 3, 409 - 418.

LACY, G. H., 1978:
Plasmid RP 1 in Erwinia chrysanthemii strains pathogenic on maize.
Phytopathology, 68, 1323 - 1330.

LAI, M., PANOPOULOS, N. J., SHAFFER, S., 1977:
Transmission of T plasmids among Xanthomonas spp. and other plant pathogenic bacteria.
Phytopathology, 67, 1044 - 1055.

LAGERWERFF, J. V., 1967:
Heavy-metal contamination of soils.
Agr Qual Environ, 85, 353 - 364.

LEBEN, C., ARNY, D. C., KEITT, G. W., 1954:
Effectiveness of certain antibiotics for the control of seed-borne diseases of small grain.
Phytopathology, 44, 704 - 707.

LIMONARD, T., 1968:
Ecological aspects of seed health testing.
Proc Int Seed Test Ass Congr, 33, 10 - 54

LITTLE, P., 1973:
A study of heavy metal contamination of leaf surfaces.
Environ Pollut, 5, 159 - 172.

MARQUES, A. M., CONGREGADO, F., SIMON-PUJOL, D. M., 1979:
Antibiotic and heavy metal resistance of Pseudomonas aeruginosa isolated from soils.
J Appl Microbiol, 47, 347 - 350.

MISATO, T., KO, K., YAMAGUCHI, J., 1976:
Use of antibiotics in agriculture.
Adv appl microbiol, 18, 53 - 88.

MONDAL, R., MUKHERJEE, N., 1978:
Sensitivität einiger phytopathogener Bakterien gegen einige Antibiotika, Bakterizide und andere Medikamente.
Z Pfl Kr, 85, 607 - 616.

MURNEEK, A. E., 1952:
Thiolutin as a possible inhibitor of fire blight.
Phytopathology, 42, 57.

NAYAK, M. L., SINGH, H. P., VERMA, J. P., 1976:
Effective chemical sprays to control the bacterial blight of cotton.
Z Pfl Kr, 83, 407 - 415.

NUGENT, M. E., BONE, D. H., DATTA, N. 1979:
A transposon, Tn 732, encoding gentamicin/tobramici resistance.
Nature, 282, 422.

NULTSCH, W., 1959:
Zur Frage der Bekämpfung bakt. Pflanzenkrankheiten durch Beizung.
Meded Landb Hoogesch Wag, 24, 690 - 696.

O'BRIAN, T. F., ROSS, D. G., GUZMAN, M. A., MEDEIROS, A. A., HEDGES, R. W., BOTSTEIN, D., 1980:
Dissemination of an antibiotic resistence plasmid in hospital patient flora.
Antimicr Ag Chemother, 17, 537 - 543.

OGAWA, J. M., MANJI, B. T., CHASTAGNER, G. A., 1976:
Symposium on resistance of plant pathogens to chemicals.
Invitational papers presented at the sixty-eights annual meeting of the american phytopathological society, Kansas City, Missouri, July 13, 1976.

OGAWA, J. M., GILPATRICK, J. D., CHIARAPPA, L., 1977:
Review of plant pathogens resistant to fungicides and bactericides.
FAO Plant Prot Bull, 25, 629 - 635.

PANOPOULOS, N. J., GUIMARES, W. V., CHO, J. J., SCHROTH, M. N., 1974:
Conjugatve transfer of Pseudomonas aeruginosa R factors to plant pathogenic Pseudomonas spp.
Phytopathology, 65, 380 - 388.

LEBENSLAUF

Ich, Nikolaus Thomas Kowollik, wurde zusammen mit meiner Zwillingsschwester Hanna als Kind des Richters Karl Kowollik und seiner Ehefrau Hanna Kowollik, geb. Drewniok, am 4.2. 1956 in Karlsruhe/Baden-Württemberg geboren.

1963 - 1967	Besuch der Volksschule in Karlsruhe
1967 - 1975	Besuch des Max-Planck-Gymnasiums in Karlsruhe-Rüppurr mit Abschluß des Reifezeugnisses im Juni 1975
1975 - 1981	Beginn des Tiermedizinstudiums an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Abschluß im Februar 1981 und Approbation als Tierarzt im Mai 1981
1981 - 1983	Dissertationsarbeit am Institut für Med. Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät München
1983	Seit Mai 1983 Assistent in der Tierklinik von Dr. H. Röcken in Starnberg

Frau Prof. Dr. B. Gedek möchte ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die mir jederzeit gewährte Aussprache herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. DDr. h. c. A. Mayr danke ich sehr für die mir bereitwillig gewährte Arbeitsmöglichkeit und sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau S. Maron für die mir jederzeit gewährte Unterstützung.

Herrn Dr. Bauer und Herrn Dr. Gareis danke ich sehr herzlich für wertvolle Ratschläge